



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN
TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A. C.



**EFFECTO DEL ULTRASONIDO EN LA EXTRACCIÓN Y
NANOENCAPSULACIÓN DE POLIFENOLES DE LIMÓN PERSA
(*CITRUS LATIFOLIA*)**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA
EN LA ESPECIALIDAD DE INNOVACIÓN BIOTECNOLÓGICA**

PRESENTA

Q. NELLY CAROLINA MEDINA TORRES

Director: Dra. Neith Aracely Pacheco Lopez

Co-director: Dr. Hugo Espinosa Andrews

Co-director: Dra. María de los Angeles Sánchez Contreras

Asesor: Dra. Teresa Ayora Talavera

Asesor: M. en C. Tania González Flores

MÉRIDA, YUC. NOVIEMBRE, 2017

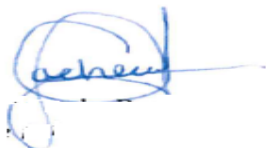
Mérida, Yucatán, a 17 de Octubre del 2017

CONSEJO INSTITUCIONAL DE POSGRADO
DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO
DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.

PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del comité tutorial de la estudiante **Nelly Carolina Medina Torres**, una vez leída y revisada la Tesis titulada “**EFFECTO DEL ULTRASONIDO EN LA EXTRACCIÓN Y NANOENCAPSULACIÓN DE POLIFENOLES DE LIMÓN PERSA (CITRUS LATIFOLIA)**” aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el/la estudiante para aspirar al grado de Maestro en Innovación Biotecnológica con opción terminal en Biotecnología Agroalimentaria durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente al día 17 del mes de octubre del año dos mil diecisiete.



Dra. Neith Aracely Pacheco López

Director de tesis/tutor académico



Dra. Teresa del Rosario Ayora Talavera

Asesora



Dra. Maria de los Angeles Sánchez Contreras

Co-director de tesis/tutor en planta



M en C. Tania González Flores

Asesora



Dr. Hugo Espinosa Andrews

Co-director de tesis/tutor



Mérida, Yucatán, a 17 de Octubre del 2017

CONSEJO INSTITUCIONAL DE POSGRADO

DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO
DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.

PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del Jurado del Examen de Grado de la estudiante **Nelly Carolina Medina Torres**, una vez leída y revisada la Tesis titulada “**EFFECTO DEL ULTRASONIDO EN LA EXTRACCIÓN Y NANOENCAPSULACIÓN DE POLIFENOLES DE LIMÓN PERSA (CITRUS LATIFOLIA)**” aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el/la estudiante para aspirar al grado de Maestro en Innovación Biotecnológica con opción terminal en Biotecnología Agroalimentaria durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente al día 7 del mes de Noviembre del año dos mil diecisiete.

Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto

Presidente

Dra. Miriam Fabiola Fabela Morón

Secretaria

Dr. Juan Carolos Cuevas Bernardino

Vocal

TÍTULO

**EFECTO DEL ULTRASONIDO EN LA EXTRACCIÓN Y
NANOENCAPSULACIÓN DE POLIFENOLES DE LIMÓN PERSA
(*CITRUS LATIFOLIA*)**

Presenta: Q. Nelly Carolina Medina Torres

JUNTA DIRECTIVA

Director: Dra. Neith Aracely Pacheco López

Co-director: Dr. Hugo Espinosa Andrews

Co-director: Dra. María de los Angeles Sánchez Contreras

Asesor: Dra. Teresa Ayora Talavera

Asesor: M. en C. Tania González Flores

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Al Fondo Sectorial de Investigación para la Educación: Secretaría de Educación Pública - Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (SEP-CONACYT), por el financiamiento otorgado a través del proyecto Ciencia Básica: CB2015-01, Número 258118.

Al CONACYT, por el sustento otorgado para la realización del proyecto a través de la beca de manutención con número de asignación: 591403, así como el apoyo para movilidad en el extranjero, mediante el programa de becas mixtas.

Al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ) Unidad Sureste, por su amplia disposición para el uso de las instalaciones y de equipos necesarios para la realización de esta Tesis.

A la Dra. Neith Pacheco López, quien fungió como directora del proyecto, ya que siempre mostró un gran sentido de compromiso, constante asistencia, consejo y comprensión.

A la junta directiva conformada por la Dra. Ángeles Sánchez Contreras, la Dra. Teresa Ayora Talavera y la M. en C Tania Gonzáles Flores, por sus valiosas correcciones y recomendaciones durante la realización de la Tesis. En especial al Dr. Hugo Espinosa Andrews, quien además de haber sido codirector, fue de gran apoyo al recibirme durante la estadía en CIATEJ, Unidad Zapopan.

Al Dr. Stéphane Trombotto, cuya participación fue crucial para el desarrollo del proyecto, durante la estancia realizada en el Laboratorio de Ingeniería de materiales poliméricos, en la Universidad Claude Bernard. En colaboración con el Dr. Laurent David, el Dr. Pierre Alcouffe, la Dra. Agnes Crepet, y el Dr. Rubén Vera.

A la Dra. Keiko Shirai Matsumoto, la Dra. Miriam Fabela Morón, y el Dr. Juan Cuevas Bernardino, quienes participaron como miembros del comité de evaluación, cuyas aportaciones fueron de gran valor para la mejora y culminación del proyecto.

Finalmente a la colaboración desinteresada de investigadores, compañeros y amigos, los cuales contribuyeron a la realización de este trabajo.

DEDICATORIAS

A mis padres quienes me dieron vida, educación y siempre fueron un gran impulso para mí, alentándome a seguir y cumplir mis metas. A mis hermanos, les dedico este trabajo que espero sea de motivación para ellos para que también busquen cumplir sus metas y objetivos.

A mis amigos y seres más queridos, ya que siempre estuvieron conmigo tanto en los buenos y malos momentos y en especial por la paciencia que siempre me tuvieron.

A mis profesores académicos, quienes creyeron en mí y fueron la guía para que ahora pueda culminar este proyecto, en el cual intente plasmar un gran esfuerzo, pasión y entusiasmo.

A Dios, en agradecimiento por todas las personas maravillosas que forman parte de mi vida.

I. ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
3. MARCO TEÓRICO.....	5
3.1. Polifenoles: características y potencial biológico.....	5
3.2. Métodos de extracción de polifenoles	7
3.3. Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU)	8
3.3.1. Efecto de las variables involucradas en la eficiencia y rendimiento de EAU	11
3.3.2. Optimización EAU	13
3.3.3. Escalamiento EAU	13
3.3.4. Comparación EAU con otros métodos de extracción	14
3.4. Utilización de materias primas renovables para la obtención de polifenoles	15
3.5. Aprovechamiento de residuos de limón para la obtención de polifenoles.....	16
3.5.1. Actividad antioxidante de polifenoles procedentes de cítricos.....	16
3.5.2. Actividad antimicrobiana de polifenoles procedentes de cítricos.....	17
3.6. Estrategias para mejorar la baja estabilidad y biodisponibilidad de los polifenoles	18
3.7. Biopolímeros: quitina y quitosano.....	20
3.7.1. Fuente de obtención de quitina	21
3.7.2. Métodos de extracción de quitina	22
3.8. Quitosano	22
3.9. Métodos de obtención de quitosano	23
3.9.1. Método químico convencional.....	23
3.9.2. Método enzimático	24
3.9.3. Método asistido por ultrasonido.....	24
3.10. Propiedades fisicoquímicas del quitosano	24
3.10.1. Grado de acetilación del quitosano	25
3.10.2. Peso molecular del quitosano.....	26
3.10.3. Solubilidad del quitosano	27
3.10.4. Actividad antioxidante del quitosano	27
3.10.5. Actividad antimicrobiana del quitosano	28
3.11. Aplicaciones del quitosano	28
3.12. Quitosano empleado para la encapsulación de compuestos activos.....	29

ÍNDICE DE CONTENIDOS

3.12.1. Coacervación o precipitación.....	30
3.12.2. Secado por aspersión	30
3.12.3. Reticulación	30
3.12.4. Gelificación iónica	31
3.13. Encapsulación de polifenoles empleando nanopartículas de quitosano	32
4. JUSTIFICACIÓN	33
5. HIPÓTESIS	34
6. OBJETIVO GENERAL	35
6.1. Objetivos particulares	35
7. METODOLOGÍA	36
7.1 Estrategia experimental.....	36
7.2. Reactivos.....	36
7.3. Etapa 1: Extracción de polifenoles asistida por ultrasonido	37
7.3.1. Material biológico para extracción de polifenoles	37
7.3.2. Obtención de harina de residuos de limón persa	37
7.3.3. Caracterización fisicoquímica de la harina.....	38
7.3.3.1. Determinación de humedad.....	38
7.3.3.2. Determinación de actividad de agua.....	38
7.3.3.3. Determinación de pH.....	38
7.3.3.4. Determinación de acidez titulable	38
7.3.3.5. Determinación de color.....	39
7.3.3.6. Determinación de sólidos solubles	39
7.3.3.7. Determinación de cenizas	39
7.3.4. Metodología de superficie de respuesta para la extracción de polifenoles	40
7.3.5. Cuantificación de polifenoles totales	41
7.3.5.1. Método espectrofotométrico.....	41
7.3.5.2. Análisis UPLC-PDA.....	42
7.3.6. Evaluación de la capacidad antioxidante de los polifenoles.....	42
7.3.6.1. Evaluación por el método de DPPH•.....	42
7.3.6.2. Evaluación por el método de ABTS•.....	43
7.3.7. Determinación de la actividad antibacteriana de los polifenoles.....	43
7.3.7.1. Concentración mínima inhibitoria	43
7.4. Etapa 2: Obtención de quitosano asistida por ultrasonido	44

ÍNDICE DE CONTENIDOS

7.4.1. Material biológico para obtención de quitosano	44
7.4.2. Extracción de quitina.....	44
7.4.2.1. Desmineralización	44
7.4.2.2. Desproteínización	45
7.4.3. Desacetilación asistida por ultrasonido	45
7.4.4. Evaluación de la solubilidad del quitosano	46
7.4.5. Caracterización fisicoquímica de quitosano	46
7.4.5.1. Determinación de proteína por el método Kjeldahl.....	46
7.4.5.2. Determinación del DA por RMN-H ¹	46
7.4.5.3. Determinación del PM por cromatografía de exclusión de tamaño	47
7.4.5.4. Análisis de espectroscopia de Infrarrojo-Transformada de Fourier	47
7.4.5.5. Análisis de difracción de rayos-X.....	47
7.5. Etapa 3A: Formación de nanopartículas de quitosano por gelificación iónica	47
7.5.1. Tamaño medio de partícula e índice de polidispersión	48
7.5.2. Potencial Z de las partículas de quitosano.....	49
7.6. Etapa 3B: Encapsulación de polifenoles.....	49
7.6.1. Eficiencia de encapsulación.....	49
7.6.2. Eficiencia de liberación	50
7.7. Etapa 4: Caracterización fisicoquímica de los encapsulados	50
7.7.1. Calorimetría diferencial de barrido	50
7.7. 2. Análisis termogravimétrico	51
7.7. 3. Evaluación de la actividad antioxidante y antibacteriana de los encapsulados	51
8. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	52
8.1. Etapa 1: Extracción de polifenoles asistida por ultrasonido	52
8.1.1. Obtención y caracterización de harina de limón persa.....	53
8.1.2. Metodología de superficie de respuesta para obtención de polifenoles	54
8.1.3. Análisis de los efectos evaluados durante la EAU.....	59
8.1.3.1. Efecto de porcentaje de amplitud	59
8.1.3.2. Efecto de relación soluto-solvente.....	59
8.1.3.3. Efecto de tiempo de extracción	60
8.1.3.4. Efecto de concentración del solvente.....	60
8.1.3.5. Efecto de la naturaleza del solvente: análisis cromatográfico.....	60
8.1.4. Efecto del método de extracción y el pre-tratamiento de la muestra	64

ÍNDICE DE CONTENIDOS

8.1.5. Actividad antimicrobiana del extracto polifenólico	66
8.2. Etapa 2: Obtención de quitosano asistida por ultrasonido	67
8.2.1. Diseño factorial 2^3 para la obtención de quitosano asistida por ultrasonido	68
8.2.2. Influencia de las variables sobre la desacetilación asistida por ultrasonido	69
8.2.3. Estudio de la dependencia temperatura vs. tiempo durante la desacetilación	70
8.2.4. Caracterización fisicoquímica del quitosano obtenido por ultrasonido (QU)	71
8.2.4.1. Determinación del DA del QU	71
8.2.4.2. Determinación del PM del QU	71
8.2.4.3. Análisis del QU por IR-FT	71
8.2.4.3. Análisis del QU por difracción de rayos $-X$	72
8.3. Etapa 3A: Formación de nanopartículas de quitosano por gelificación iónica	72
8.3. 1. Análisis sobre el tamaño de partícula	74
8.3. 2. Análisis sobre el potencial Z	75
8.3. 3. Análisis sobre el índice de polidispersión	76
8.4. Etapa 3B: Encapsulación de polifenoles	77
8.4.1. Eficiencia de encapsulación	78
8.4.2. Eficiencia de liberación	79
8.5. Etapa 4: Caracterización fisicoquímica de los encapsulados	82
8.5.1. Análisis de los encapsulados por IR-FT	82
8.5.2. Análisis de los encapsulados por difracción de rayos $-X$	83
8.5.3. Análisis de los encapsulados por DSC	84
8.5.4. Análisis de los encapsulados por TGA	87
8.5.5. Tamaño, Potencial Z e IPD de los encapsulados	88
8.5.6. Evaluación de la actividad antioxidante de los encapsulados	89
8.5.6. Evaluación de la actividad antibacteriana de los encapsulados	91
9. CONCLUSIONES	92
10. PERSPECTIVAS	95
11. REFERENCIAS	96
11. ANEXOS	109
11.1. Curvas de calibración	109
11.2. Gráficos empleados para la caracterización del DA y PM del quitosano	110
11.3. Presentación en congresos	112
11.4. Artículo de Revisión	115

II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras moleculares de los flavonoides.....	5
Figura 2. Clasificación general de los polifenoles	6
Figura 3. Principio de cavitación acústica	9
Figura 4. Representación gráfica del fenómeno de cavitación, colapso y liberación del material vegetal.	10
Figura 5. Representación de un equipó de ultrasonido acoplado a una sonda	10
Figura 6 Grupos funcionales en la estructura flavonoide con alta capacidad antioxidante	17
Figura 7. Factores que influyen en la baja biodisponibilidad de los polifenoles.....	18
Figura 8. Biomoléculas basadas para la encapsulación y liberación de polifenoles	19
Figura 9. Conformación química de las moléculas de α - quitina (Izquierda) y β -quitina (derecha)	20
Figura 10. Estructura química de quitina y quitosano	23
Figura 11. Espectro de RMN- H^1 correspondiente a una muestra de quitosano disuelto en D_2O , pH= 4, T= 85 °C, concentración 5 g/L.....	26
Figura 12. Principales aplicaciones reportadas para el uso de quitosano	29
Figura 13. Interacción electrostática entre quitosano y TPP	31
Figura 14 Principales variables involucradas en la formación de nanopartículas de quitosano por gelificación iónica	32
Figura 15. Estrategia experimental propuesta para la encapsulación de polifenoles de limón persa	36
Figura 16. Diagrama de flujo del proceso de obtención de polifenoles procedentes de residuos de limón persa (<i>Citrus latifolia</i>) de acuerdo a las condiciones óptimas de EAU.....	52
Figura 17. Gráfico de Pareto estandarizado para la extracción de polifenoles de limón persa.	56
Figura 18. Gráficos de superficie de respuesta que muestran el efecto de los factores evaluados sobre el contenido polifenoles totales (PT)..	58
Figura 19. Cuantificación de polifenoles totales por UPLC.....	61
Figura 20. Porcentaje de contribución de cada uno de los compuestos polifenólicos identificados en los extractos evaluado.....	63
Figura 21. Cromatogramas obtenidos por UPLC para la evaluación del efecto de la concentración del solvente.	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 22. Correlación de polifenoles totales vs actividad antioxidante.	65
Figura 23. Diagrama de flujo del proceso de obtención de quitosano procedentes de residuos de camarón blanco (<i>Litopenneaus vanamei</i>) de acuerdo a las mejores condiciones de desacetilación asistida por ultrasonido.	67
Figura 24. Diagrama de Pareto estandarizado para la respuesta de solubilidad de quitosano en ácido acético al 1%	69
Figura 25. Dependencia de la temperatura con respecto al tiempo de irradiación de ultrasonido de acuerdo a las condiciones: 65% de NaOH, 90 % amplitud y un intervalo de sonicación de 5-5 min.	70
Figura 26. Espectros de quitosano de IR-FT obtenidos usando un espectrómetro Agilent Cary 630, en modo de reflectancia total atenuada.	72
Figura 27. Patrones de difracción de Rayos X de QU y QS, obtenido mediante un difractómetro Bruker modelo D8 Advance	72
Figura 28. Diagrama de Pareto estandarizado para la respuesta de tamaño	74
Figura 29. Diagrama de Pareto estandarizado para la respuesta de potencial Z	75
Figura 30. Diagrama de Pareto estandarizado para la respuesta de IPD.....	76
Figura 31. Resultados del % E-Lib para la formulación D.	80
Figura 32. Resultados del % E-Lib en CaCl ₂	81
Figura 34. Patrones de difracción de Rayos X de QU y Nps de quitosano (Q-TPP)	83
Figura 35. Patrones de difracción de Rayos X de las formulaciones B, C, D y el control	84
Figura 36. Curvas DSC de quitosano (A), Nps de quitosano (B), Cap-A (C).	85
Figura 37. Curvas TGA de quitosano, Nps de quitosano, Cap-A y Cap-control.	87

III. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características principales, ventajas y desventajas de las tecnologías de extracción novedosas y convencionales.....	7
Tabla 2. Efecto de las variables implicadas en la extracción asistida por ultrasonido (EAU) en la recuperación de polifenoles procedentes de diferentes fuentes vegetales.....	11
Tabla 3. Comparación del contenido de las principales fuentes de obtención de quitina.....	21
Tabla 4. Métodos de caracterización para la determinación del DA en quitosano.....	25
Tabla 5. Factores y niveles propuestos para la extracción de polifenoles asistida por ultrasonido	40
Tabla 6. Factores y niveles propuestos para la desacetilación de quitina asistida por ultrasonido	45
Tabla 7. Factores y niveles propuestos para la obtención de nanopartículas de quitosano	48
Tabla 8. Resultados de la caracterización fisicoquímica de la harina de limón persa (<i>Citrus latifolia</i>).....	53
Tabla 9. Contenido de polifenoles totales del extracto de limón persa bajo diferentes condiciones de extracción asistida por ultrasonido basado en un Diseño Box-Behnken para el análisis de superficie de respuesta.	55
Tabla 10. Análisis de varianza (ANOVA) para la optimización de extracción polifenoles de limón persa	56
Tabla 11. Coeficientes de regresión estimados para los factores evaluados en la extracción de polifenoles de limón persa.....	57
Tabla 12. Resultados de CMI para los extracto polifenólicos: TU, TM y FE. Determinados por el método de dilución en placa de 96 pozos.....	66
Tabla 13. Resultados de las pruebas de solubilidad realizadas a los diferentes tratamientos de quitosano asistido por ultrasonido.	68
Tabla 14. Análisis de varianza para la determinación de solubilidad de los quitosanos obtenidos por ultrasonido	69
Tabla 15. Potencial Z, tamaño de partícula e IPD de las Nps de quitosano preparadas bajo diferentes condiciones de formación por gelificación iónica.....	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 16. Análisis de varianza de los resultados obtenidos a partir del proceso de gelificación iónica.	74
Tabla 17. Condiciones seleccionadas para la elaboración de Nps de quitosano cargadas con polifenoles procedentes de limón persa	78
Tabla 18. Resultados del % E-Cap de los polifenoles encapsulados con Nps de quitosano.....	78
Tabla 19. Resultados de la determinación del tamaño de partícula, potencial Z e IPD para los compuestos polifenólicos encapsulados.....	88
Tabla 20. Actividad antioxidante de los controles, de los compuestos polifenólicos encapsulados y liberados, determinada mediante el ensayo de ABTS. Expresada como mg eq. Trolox.	90
Tabla 21. Resultados de CMI de los controles, de los compuestos polifenólicos encapsulados y liberados. Determinados por el método de dilución en placa de 96 pozos	91

III. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Símbolo	Definición
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico
ANOVA	Análisis de varianza
Aw	Actividad de agua (en inglés, water activity)
Bs	Base seca
°C	Grados Celsius
Cap-A	Cápsula-Tratamiento A (pH: 4.5, quitosano 0.2%, TPP 0.10%, Q-TPP 3-1)
Cap-B	Cápsula-Tratamiento B (pH: 5.5, quitosano 0.2%, TPP 0.10%, Q-TPP 7-1)
Cap-C	Cápsula-Tratamiento C (pH: 4.5, quitosano 0.5%, TPP 0.25%, Q-TPP 3-1)
Cap-D	Cápsula-Tratamiento D (pH: 5.5, quitosano 0.5%, TPP 0.25%, Q-TPP 7-1)
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DA	Grado de acetilación (%)
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DSC	Calorimetría diferencial de barrido (en inglés, Differential Scanning Calorimetry)
EAG	Equivalente a ácido gálico
EAM	Extracción asistida por microondas
EAU	Extracción asistida por ultrasonido
E-Cap	Eficiencia de encapsulación
E-Lib	Eficiencia de liberación
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FM	Extracto polifenólico obtenido a partir de residuos de limón persa en estado fresco
FT-IR	Espectroscopía infrarroja por Transformadas de Fourier (en inglés, Fourier transform infrared)
GRAS	Generalmente reconocido como seguro (en inglés, Generally Recognized As Safe)
H	horas
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (en inglés, High pressure liquid chromatography)
kHz	Kilo Hertz
IPD	Índice de polidispersión
kDa	Kilo Dalton

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Símbolo	Definición
Lib-B	Liberado-Tratamiento B (pH: 5.5, quitosano 0.2%, TPP 0.10%, Q-TPP 7-1)
Lib-C	Liberado-Tratamiento C (pH: 5.5, quitosano 0.5%, TPP 0.25%, Q-TPP 3-1)
Lib-D	Liberado-Tratamiento D (pH: 4.5, quitosano 0.5%, TPP 0.25%, Q-TPP 7-1)
M	Molar
Min	Minutos
MSR	Metodología de superficie de respuesta
mV	Mili Volt
Nps	Nanopartículas
-OH	Hidroxilo
PBS	Buffer fosfato
pH	Potencial de hidrógeno
PM	Peso molecular
ppm	Partes por millón
PT	Polifenoles totales
QS	Quitosano obtenido por Sigma-Aldrich
QU	Quitosano obtenido por ultrasonido
RMN-H ¹	Espectroscopía de Resonancia magnética nuclear de protón
SEC	Cromatografía de exclusión por tamaños (en inglés, size exclusion chromatography)
Tg	Temperatura de transición vítrea
TGA	Análisis termogravimétrico (en inglés, thermal gravimetric analysis)
TM	Extracto polifenólico obtenido a partir de la técnica de maceración convencional
TPP	Tripolifosfato de sodio
TU	Extracto polifenólico obtenido a partir de las condiciones óptimas de ultrasonido
UA	Extracto polifenólico obtenido empleando agua como solvente
UE	Extracto polifenólico obtenido empleando etanol 96 % como solvente
UV	Ultravioleta-visible
UPLC	Cromatografía líquida de ultra resolución (en inglés, Ultra pressure liquid chromatography)

1. RESUMEN

El aprovechamiento de residuos agroindustriales procedentes de fuentes vegetales para la obtención de compuestos polifenólicos, ha sido objeto de diversos estudios, debido a que los polifenoles son ampliamente valorados gracias a su potencial biológico. Además de la búsqueda del aprovechamiento integral para la obtención de subproductos de valor agregado, se ha destacado la importancia de implementar métodos novedosos de extracción, con el objetivo de atender a las limitantes presentadas por los métodos convencionales. Dentro de las tecnologías novedosas de extracción, resalta la Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU), la cual permite ofrecer altos rendimientos de extracción, minimizando costos y tiempos de proceso, por lo que es considerada como sustentable con el ambiente. Por lo tanto, el presente trabajo de investigación consistió en el evaluar el efecto del ultrasonido y de las variables intrínsecas al proceso de gelificación iónica, sobre la actividad antibacteriana y antioxidante de nanopartículas (Nps) de quitosano cargadas con polifenoles extraídos de residuos de limón persa (*Citrus latifolia*). Para el estudio, se propuso una estrategia experimental dividida en cuatro etapas, planteando un objetivo particular en cada etapa realizada. El sistema de ultrasonido utilizado para la realización del estudio fue operado a 130 W y 20 kHz, acoplado a una sonda de 13 mm de diámetro.

En la primera etapa se estudió el efecto de la EAU sobre el rendimiento de extracción de polifenoles de limón persa. Los resultados obtenidos, indicaron que la concentración de etanol (X_1), amplitud de radiación (X_2), tiempo de sonicación (X_3) y relación soluto-solvente (X_4) tuvieron efecto significativo ($p < 0.05$) sobre la variable de respuesta. Las condiciones óptimas determinadas fueron: X_1 : 50%, X_2 : 10 min, X_3 : 90.59% y X_4 : 1/50 g/mL, cuyo valor máximo estimado para el rendimiento de extracción fue igual a 17.14 mg EAG/g bs, superando el rendimiento obtenido por el método convencional (10.5 mg EAG/g bs). El análisis del perfil cromatográfico por UPLC identificó a la hesperidina y eriocitrina como los polifenoles de mayor abundancia, encontrándose en menor proporción a los ácidos fenólicos (clorogénico > sinápico > elágico > cafeico).

La segunda etapa del estudio consistió en determinar la influencia de la concentración del hidróxido de sodio, amplitud de irradiación y el intervalo de sonicación sobre eficiencia de

desacetilación, para la obtención de quitosano, procedente del exoesqueleto de camarón blanco (*Litopenneaus vanamei*). El ANOVA de los resultados indicó que todas variables evaluadas tuvieron efecto significativo ($p < 0.05$). El quitosano obtenido bajo las mejores condiciones de desacetilación asistida por ultrasonido pudo alcanzar una solubilidad del 100%, con un DA de 13.04%, al emplearse una concentración de hidróxido de sodio del 65%, amplitud del 90 % y un intervalo de sonicación de 5-5 min (5 en sonicación-5 en agitación magnética) hasta llegar a los 90 min de proceso. Los resultados de la caracterización indicaron que el PM del quitosano fue de 392 kDa, considerando al biopolímero dentro del intervalo de alto PM.

Debido a que los polifenoles presentan baja estabilidad, solubilidad y biodisponibilidad, se procedió a desarrollar un sistema de protección, por lo cual, se propuso la tercera etapa del estudio, cuyo objetivo consistió en la formación de Nps de quitosano como agente encapsulante (etapa 3A) y la posterior encapsulación del extracto polifenólico (etapa 3B). Para la etapa 3A, se estudió el efecto de las variables intrínsecas al proceso de gelificación iónica, sobre el tamaño, densidad de carga e índice de polidispersión (IPD) de las partículas de quitosano. Los resultados del ANOVA indicaron que la concentración de quitosano, la relación con el agente reticulante, el pH, el tiempo de agitación y el uso de sonicación presentaron efectos significativos sobre las 3 variables de respuesta. Mientras que en la etapa 3 B, se procedió a estudiar el efecto del tamaño, densidad de carga e IPD de las Nps de quitosano sobre la eficiencia de encapsulación de los polifenoles del extracto de limón persa, cuya eficiencia de encapsulación osciló entre el intervalo del 47.48 ± 0.34 al 53.50 ± 0.25 %.

Finalmente, en la cuarta etapa se realizó la caracterización de los encapsulados desarrollados mediante el uso de técnicas de espectroscopía de infrarrojo, difracción de rayos-X, las cuales evidenciaron las interacciones entre el quitosano, el TPP y los compuestos polifenólicos. Por otra parte, los resultados de la evaluación de la actividad antioxidante, indicaron que la actividad del extracto se mantuvo durante la encapsulación (615.38 ± 19.29 mg eq. Trolox) y posterior liberación (600.62 ± 29.74 mg eq. Trolox). Así mismo, se observó una mejora en actividad antibacteriana de hasta un 60 % en comparación con el extracto libre. Lo anterior sugiere un efecto sinérgico entre los compuestos presentes en el sistema de encapsulación, cuyo potencial biológico podría ser explotado particularmente en el área de la industria alimentaria.

2. INTRODUCCIÓN

La importancia biológica de los polifenoles ha dado lugar a un gran número de estudios enfocados a su extracción a partir de diversas fuentes vegetales. En los últimos años, estas tecnologías de extracción se han innovado con el objetivo de ofrecer altos rendimientos en el proceso, minimizando tiempos, costos, pero sobre todo, que sean sustentables con el medio ambiente. Entre las diversas tecnologías, la Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU) destaca como una alternativa innovadora, considerada como una tecnología de fácil manejo, segura, económica, reproducible y sustentable, al requerir una inversión moderada de energía y solvente (Soria & Villamiel 2010; Vieira et al. 2013).

El potencial biológico de los polifenoles se encuentra limitado por su baja solubilidad y estabilidad frente a factores ambientales (luz, temperaturas elevadas (>50 °C) y a cambios de pH) (Parisi et al. 2014). Lo anterior, ha impulsado el desarrollo de mecanismos de protección, mediante el uso de Nps de materiales biopoliméricos, empleados para mejorar la solubilidad de los compuestos polifenólicos, disminuyendo además, el riesgo de la oxidación/degradación en el tracto gastrointestinal. Otro aspecto importante de la nano-encapsulación es que permite además, aumentar significativamente la absorción y biodisponibilidad, debido a que las Nps pueden ser captadas por las células epiteliales directamente en el intestino delgado (Li et al. 2015).

Por lo cual, el presente estudio de investigación planteó la EAU de polifenoles de limón persa (*Citrus Latifolia*), debido a que se ha reportado su potencial antioxidante y antibacteriano, atribuido principalmente a la presencia de flavonoides como la hesperidina y eriocitrina y otros compuestos de menor abundancia como los ácidos hidroxicinámicos (cafeico, clorogénico, ferúlico, sinápico y p-cumárico) (Wang et al. 2008; Chinapongtitiwat et al. 2013; Porras et al. 2004; Dzul 2014). En el estudio de EAU se evaluó el efecto de las principales variables involucradas en el proceso, incluyendo la concentración de etanol, amplitud de radiación, tiempo de sonicación y relación soluto-solvente, sobre el rendimiento de extracción de polifenoles totales. Tomando en consideración la baja estabilidad de los compuestos polifenólicos, se propuso el desarrollo de nanopartículas empleando quitosano como agente encapsulante con el objetivo de preservar la actividad antioxidante y antibacteriana. Cabe

INTRODUCCIÓN

mencionar que el quitosano empleado en el estudio se obtuvo también mediante la desacetilación asistida por ultrasonido, en donde se evaluó el efecto de la concentración de hidróxido de sodio, la amplitud de irradiación y el intervalo de sonicación, sobre la solubilidad del quitosano como medida de la eficiencia de desacetilación.

El desarrollo de nanopartículas (Nps) de quitosano se realizó mediante la técnica de gelificación iónica, la cual, consiste en una reticulación física, en donde las interacciones se llevan a cabo por interacción electrostática entre las cadenas policatiónicas del quitosano y los polianiones empleados como agentes de reticulación (Madureira et al. 2015). La elección de este método se realizó bajo el criterio de que esta técnica permite el uso de agentes de baja toxicidad (López-León et al. 2005), además de ser un proceso de simple preparación, conveniente y controlable (Rázga et al. 2016). En el proceso de gelificación se evaluó el efecto de concentración de quitosano, la relación con el agente reticulante (tripolifosfato de sodio: TPP), pH, tiempo de agitación y la asistencia de ultrasonido. Las condiciones de formación de las nanopartículas de quitosano presentaron efectos significativos sobre la eficiencia de encapsulación de los polifenoles de limón persa. Los resultados de eficiencia de encapsulación sugieren una gran capacidad de las nanopartículas de quitosano para retener altas cantidades de compuestos polifenólicos, incrementado la actividad antibacteriana, sugiriendo un efecto sinérgico entre el polifenol y el quitosano.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Polifenoles: características y potencial biológico

Los polifenoles son metabolitos derivados de origen vegetal que desempeñan un papel importante para el crecimiento y reproducción de las plantas actuando como atrayentes de polinizadores y como protección frente a depredadores. Así mismo, contribuyen a las características morfológicas y sensoriales de las plantas y subproductos (Ignat et al. 2011).

Estos compuestos son sintetizados por las vías shikimato, policétido y mevalonato, produciendo una gran variedad de metabolitos derivados del fenol, caracterizados por la presencia de uno o varios grupos hidroxilo (-OH) unido a un anillo aromático de 6 carbonos. Las estructuras químicas pueden encontrarse como agliconas libres y en formas glicosídicas, lo que significa que están ligados a azúcares como la glucosa, galactosa, ramnosa, xilosa y arabinosa (Paul & Grijalva 2016). Dentro de la clasificación de los polifenoles, destacan los compuestos flavonoides, los cuales se subdividen en 6 grupos principales, cuyas estructuras se ilustran en la figura 1 (Tripoli et al. 2007).

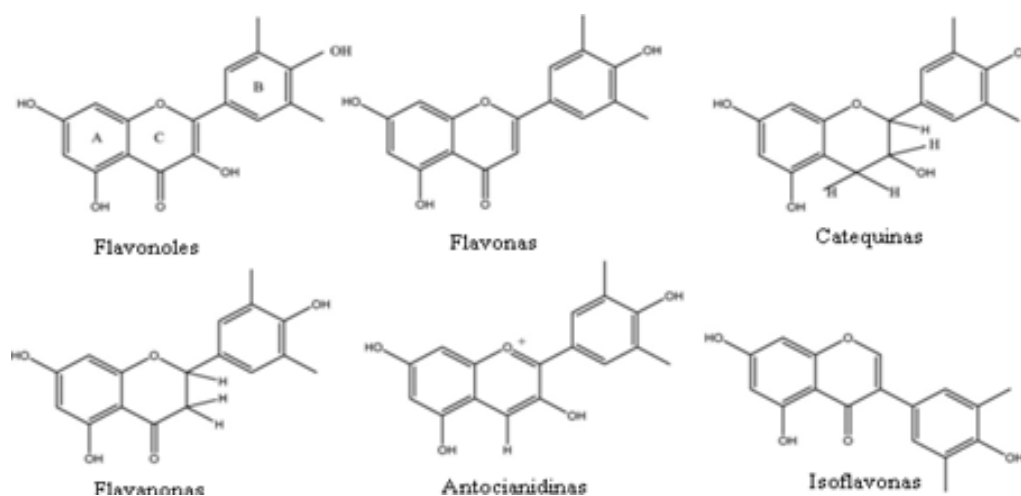


Figura 1. Estructuras moleculares de los flavonoides. La estructura básica consiste en la fusión del anillo A y C, con el anillo fenilo B unido a través de la posición 2 del anillo C. (Tripoli et al. 2007).

La clasificación, características y potencial biológico de los principales polifenoles son presentados en las figura 2, en donde se puede observar que los compuestos flavonoides sobresalen debido a su actividad biológica y diversidad que presentan (Havsteen 2002).

MARCO TEÓRICO

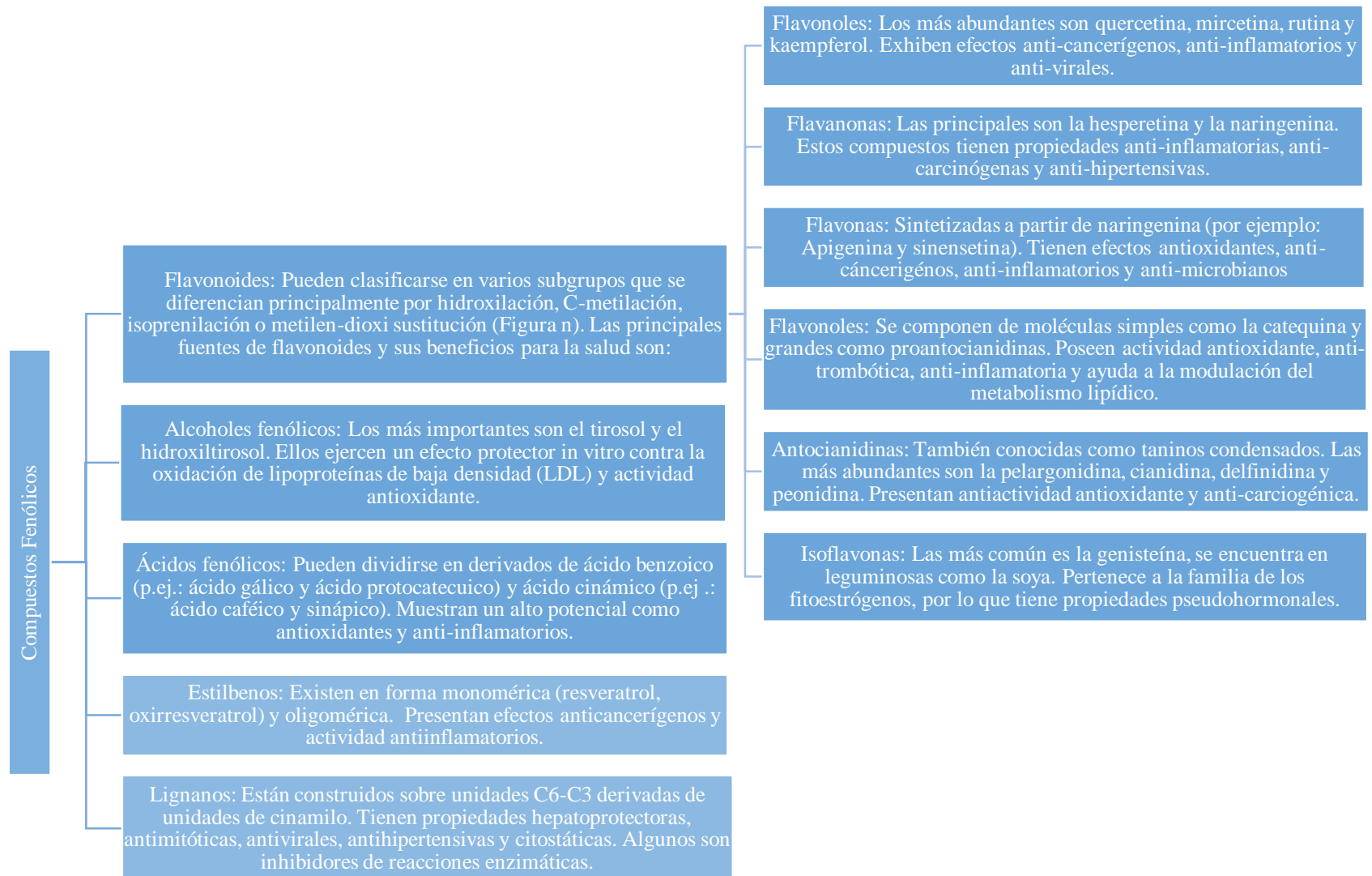


Figura 2. Clasificación general de los polifenoles (Medina-Torres et al. 2017)

3.2. Métodos de extracción de polifenoles

La gran importancia de los polifenoles ha dado lugar a un gran número de estudios enfocados a su extracción a partir de diversas fuentes vegetales. Entre las técnicas convencionales de extracción se encuentran la maceración, la cual está asociada a un alto consumo de disolventes orgánicos, cuyos remanentes limitan la aplicación de los extractos debido a la toxicidad del solvente, además de requerir largos tiempos de extracción, implicando un alto consumo energético (Porto et al. 2013). Lo anterior, ha impulsado la implementación de tecnologías novedosas de extracción asistidas por diversos mecanismos como el ultrasonido, la energía de microondas, fluidos supercríticos y mediante la extracción acelerada por disolventes (Bendicho et al. 2012). El principal objetivo de estas tecnologías es la reducción del consumo de energía y tiempo, que es reflejado en la disminución del costo, por lo que han sido denominadas como sustentables, debido a que protegen tanto al medio ambiente como a la salud de los consumidores, potenciando la competitividad económica e innovadora de las industrias (Armenta et al. 2015). A continuación, se presenta en la tabla 1 las características principales de las tecnologías de extracción convencionales y novedosas mencionadas anteriormente.

Tabla 1. Características principales, ventajas y desventajas de las tecnologías de extracción novedosas y convencionales (Bendicho et al. 2012; Chemat & Khan 2011)

Característica	Tecnología de Extracción				Método convencional	
	Asistida por ultrasonido	Asistida por microondas	Por fluidos supercríticos	Acelerada por disolventes	Agitación magnética	Soxhlet
Fuerza impulsora	Cavitación acústica	Energía de microondas	Presión en conjunto con el fluido supercrítico	Calor en conjunto con el disolvente bajo presión	Contacto con el solvente	Calor
Tiempo de extracción	10-60 min	3-30 min	10-60 min	10-20 min	1-4 h	6-24 h
Tamaño de la muestra	1-30 g	1-10 g	1-5 g	1-30 g	1-30 g	1-30 g
Disolvente	50-200 mL	10-40 mL	30-60 mL	15-60 mL	< 50 mL	150-500 mL
Inversión de energía	Moderada	Alta	Moderada	Moderada	Alta	Alta

MARCO TEÓRICO

Ventajas	Fácil manejo, segura, uso moderado de solvente	Rápido, fácil manejo, uso moderado de solvente	Rápido, seguro, no es necesario filtrar, alta selectividad	Rápido, seguro, no es necesario filtrar	No es necesario el uso de equipos sofisticados	No es necesario el uso de equipos sofisticados
Desventajas	Paso de filtración requerido, posible degradación de los analitos a altas frecuencia	Riesgo de explosión (El solvente puede absorber la energía de microondas), costosa, paso de filtración requerido	Muchos parámetros para optimizar	Posible degradación de los analitos termolábiles	Riesgo de derrames y exposición a vapores orgánicos, Posible degradación de los analitos termolábiles	Riesgo de exposición a vapores orgánicos, Degradación de analitos termolábiles

De las tecnologías de extracción presentadas en la tabla 1, la EAU resalta como una alternativa sustentable al requerir una inversión moderada de solvente y energía. Además de ser considerada de fácil manejo, segura, económica y reproducible, ya que esta tecnología permite su desarrollo bajo condiciones de presión atmosférica y temperatura ambiente (Soria & Villamiel 2010; Vieira et al. 2013).

3.3. Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU)

El ultrasonido está basado en la propagación de ondas mecánicas conformada por un conjunto de ciclos, definidos como la combinación de altas y bajas presiones, denominadas compresiones y rarefacciones, respectivamente (Awad et al. 2012; Musielak et al. 2016). Las principales características de la onda de ultrasonidos son (Tippens & Hernández 2007):

- Longitud: distancia entre dos puntos de compresión o rarefacción.
- Amplitud: altura máxima de una onda.
- Frecuencia (Hz): número de ciclos por unidad de tiempo.
- Velocidad (m/s): producto de la frecuencia por la longitud de onda.

- Potencia (W): cociente entre la energía transportada y el tiempo considerado.
- Intensidad (W/cm²): cociente de una unidad de potencia a través de una unidad de área.

Al espectro de ondas implicadas en el ultrasonido se les denomina ondas ultrasónicas, cuyas frecuencias se encuentran por encima del intervalo audible (>20 kHz) y por debajo de las frecuencias de microondas (hasta 10 MHz) (Kadam et al. 2015).

La EAU tiene como principal fuerza impulsora a la cavitación acústica (figura 3), capaz de inducir una serie de compresiones y rarefacciones en las moléculas del solvente presente, provocando la formación de burbujas como consecuencia de los cambios de temperatura y de presión (Shirsath et al. 2012).

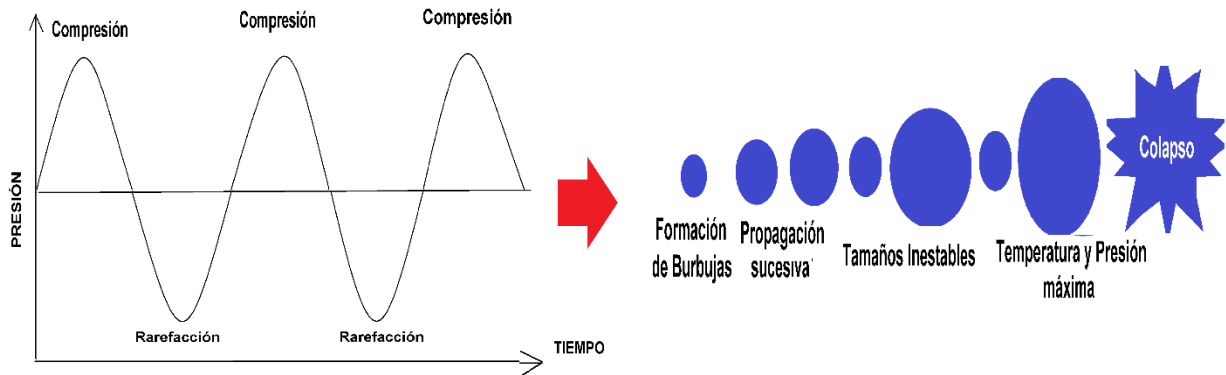


Figura 3. Principio de cavitación acústica (Medina-Torres et al. 2017).

En general, se han identificado varios mecanismos involucrados en la EAU, de los cuales destaca la fragmentación, atribuida a las colisiones entre partículas y a las ondas ultrasónicas, causando la reducción en el tamaño de partícula, lo que facilita la transferencia de masa. Otro mecanismo involucrado es la erosión, que ayuda a mejorar la accesibilidad del disolvente mediante la implosión de las burbujas sobre la superficie de la matriz vegetal. Por su parte, los efectos de sonocapilaridad y de sonoporación son capaces de mejorar la penetración de líquido a través de los canales producidos por la implosión de las burbujas, ocasionando alteraciones en la permeabilidad de las membranas celulares, respectivamente. Finalmente, el esfuerzo de cizallamiento produce el colapso de las burbujas en el fluido debido al fenómeno de oscilación (figura 4) (Chemat et al. 2017).

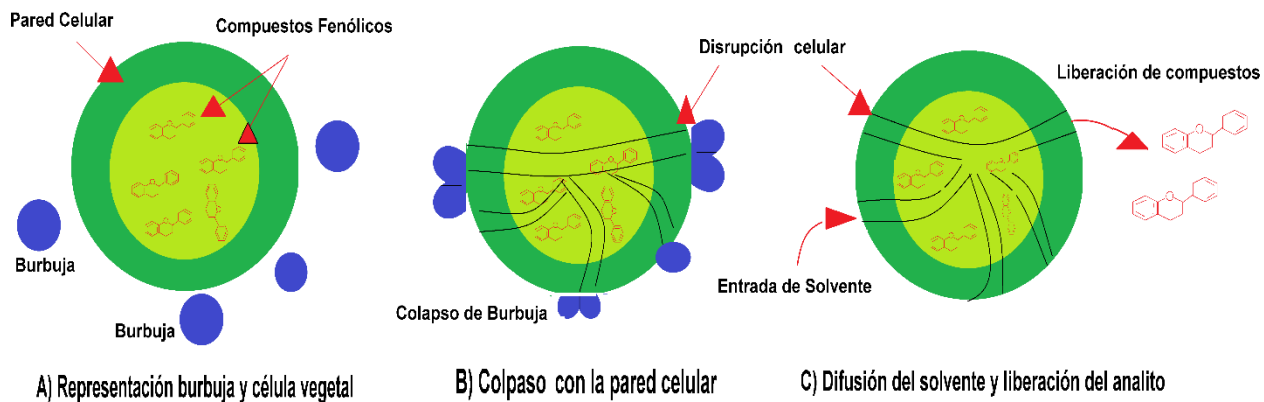


Figura 4. Representación gráfica del fenómeno de cavitación, colapso y liberación del material vegetal. (Medina-Torres et al. 2017).

La irradiación ultrasónica puede ser aplicada de dos maneras: por contacto directo con la muestra, o a través de las paredes del recipiente que contiene la muestra (indirecta), como los sistemas de baño de ultrasonido. La principal desventaja del baño de ultrasonido, es que generalmente funcionan a una sola frecuencia (20 o 40 kHz). Sin embargo, existen sistemas de extracción más eficientes, como los sistemas de extracción por ultrasonido acoplado a una sonda (figura 5), en donde el contacto directo con la muestra, le permite desarrollar una potencia de hasta 100 veces más que la proporcionada por el baño de ultrasonido (Pico 2013).

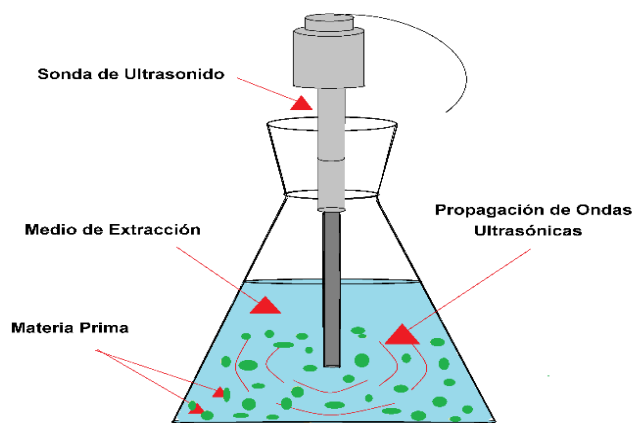


Figura 5. Representación de un equipó de ultrasonido acoplado a una sonda (Medina-Torres et al. 2017).

3.3.1. Efecto de las variables involucradas en la eficiencia y rendimiento de EAU

Durante la extracción deben considerarse una serie de variables que están directamente relacionadas con la eficiencia y el rendimiento del proceso, que incluyen el tiempo, temperatura, tipo de disolvente y la concentración utilizada, así como la manera en que el que se aplica a la irradiación de ultrasonido (directa o indirectamente). En la tabla 2, se presentan algunos ejemplos de las variables involucradas en la eficiencia y el rendimiento de la EAU para la obtención de polifenoles de diversas fuentes.

Tabla 2. Efecto de las variables implicadas en la extracción asistida por ultrasonido (EAU) en la recuperación de polifenoles procedentes de diferentes fuentes vegetales.

Variable involucrada	Fuente vegetal	Compuesto de interés	Condiciones de EAU	Rendimiento/ observaciones	Referencia
Irradiación de ultrasonido	Cáscara de granada	Polifenoles totales	Irradiación continua e irradiación pulsada	Incremento en rendimiento del 24%	(Pan et al. 2012)
Frecuencia	Semillas de uva	Polifenoles totales	25 kHz-60 kHz	Bajas frecuencias mejoraron el rendimiento de extracción	(Soria & Villamiel 2010)
	Uvas	Resveratrol	47 kHz, 14W	Rendimiento aumentó del 24 al 28%	(Barba et al. 2016)
Potencia ultrasónica	Ajo silvestre	Polifenoles totales	19.2 a 38.4 W/L	Baja potencia resultó en una mejor extracción	(Tomšik et al. 2016)
Amplitud	Uvas	Polifenoles totales	20, 50 y 100%	Ciclos más altos aumentaron la recuperación	(Meullemiestre et al. 2016)

MARCO TEÓRICO

Amplitud	Papa morada	Antocianinas	30, 50 y 70%	A mayor amplitud mayor rendimiento	(Mane et al. 2015)
Pretratamiento	Orujo de uva	Polifenoles	Secado al sol	El secado favoreció extracción	(Drosou et al. 2015)
	Papa morada	Antocianinas	Secado por congelación y microondas	Minimiza el disolvente utilizado	(Mane et al. 2015)
Relación sólido/líquido	Laurus nobilis L	Polifenoles totales	1: 4, 1: 8, 1:12	A menor relación sólido/líquido mayor rendimiento	(Muñiz-márquez et al. 2013)
Tiempo	Ajo silvestre	Polifenoles totales	40 a 80 min	Mayor tiempo resulta en mayor rendimiento	(Tomšik et al. 2016)
	Laurus nobilis L	Polifenoles totales	20, 40, 60 min	El tiempo presentó menor efecto significativo	(Muñiz-márquez et al. 2013)
Temperatura	Aronia	Antocianinas	20-70 °C	Incremento de las temperaturas mejora el rendimiento de extracción	(Galvan D'Alessandro et al. 2012)
	Ajo silvestre	Compuestos bioactivos	40-80 °C		(Tomšik et al. 2016)
	Pomelo	Flavonoides	20-70 °C		(Garcia-castello et al. 2015)
	Uva	Polifenoles totales	20-50 °C		(Tao et al. 2014)

3.3.2. Optimización EAU

Aunque el análisis de las variables implicadas en la EAU se abordó aisladamente, debe considerarse que en el sistema de ultrasonido las variables interactúan entre sí, y el producto de esta interacción se refleja en el potencial biológico de los extractos obtenidos. El análisis del efecto simultáneo de las variables se puede realizar a través de la implementación de la metodología de superficie de respuesta (MSR), una herramienta matemática y estadística que ha sido ampliamente utilizada para optimizar las condiciones experimentales de un proceso (Chen et al. 2015).

Entre los diferentes métodos, el diseño de Box-Behnken es el más frecuentemente reportado, seguido por el diseño central compuesto y el diseño experimental cúbico. El análisis de regresión sobre los resultados obtenidos a partir de la implementación de estos modelos, genera ecuaciones polinómicas (utilizando los valores significativos de los coeficientes de regresión estimados), de los cuales, se determinan las condiciones óptimas del proceso.

La principal ventaja de MSR es el pequeño número de ensayos experimentales necesarios para evaluar el efecto de múltiples parámetros en conjunto con sus interacciones (Aybastier et al. 2013), es por esta razón, que en el proceso de obtención de polifenoles por medio de EAU, esta herramienta se ha utilizado con el fin de maximizar el rendimiento de extracción y la actividad biológica del extracto.

3.3.3. Escalamiento EAU

La EAU representa una tecnología factible para el escalamiento industrial. La ventaja de escalar este método de extracción radica en la reducción del tiempo de procesamiento y altos rendimientos obtenidos, además de su sostenibilidad para el medio ambiente. Pingret et al. (2012), llevaron a cabo la extracción de compuestos fenólicos de la pulpa de manzana por EAU, utilizando como parámetro de escala, la relación disolvente-soluto (1- 500) en un tanque piloto de extracción de 30 L acoplado a una salida de ultrasonido cuádruple de 25 kHz y 200 W. Los resultados informaron un rendimiento de extracción 15% más alto que el obtenido por extracción convencional.

Por otro lado, Alexandru et al. (2013) realizaron la EAU a nivel piloto utilizando 1 kg de clavo y 20 L de disolvente empleando un sistema de múltiples sondas con cuatro cuernos de titanio impulsado por el mismo generador electrónico. Entre otros estudios de escalamiento, podemos mencionar al realizado por Meullemiestre et al. (2016), quienes obtuvieron polifenoles *Pinus pinaste*, donde el parámetro de escala fue la capacidad del reactor (1:10), con una capacidad de 30 L, obteniendo un total de 308.7 mg equivalente a quercetina (EQ)/100 g de bs.

En gestión económica, Vieira et al. (2013) estimaron el costo de fabricación (definido como la relación del coste anual de funcionamiento y la tasa de producción), de extractos crudos de palmito (*Euterpe edulis*), mediante EAU, comparado con la extracción por maceración, considerando las siguientes variables: tiempo de extracción, concentración de etanol, temperatura y la relación soluto-solvente. De acuerdo a los resultados, los extractos producidos por EAU tuvieron un costo de fabricación ligeramente superior (90.57-165.34 USD/kg) al obtenido por el proceso convencional (87.32-167.48 USD/kg). Sin embargo, el volumen de disolvente necesario para realizar EAU presentó un costo menor. Esto último, resultaría de gran interés para cualquier escalamiento de proceso, puesto que se minimiza los costos en volumen de solvente, siendo este último, uno de los insumos de mayor costo inversión. Lo anterior demuestra que la EAU representa una alternativa para la extracción de polifenoles con gran potencial de aplicación industrial.

3.3.4. Comparación EAU con otros métodos de extracción

Varios estudios demuestran la eficacia del proceso de EAU contra otros métodos convencionales o novedosos, no sólo a escala de laboratorio sino también a escala de planta piloto (Pingret et al. 2012).

Se ha reportado que EAU representa una ventaja frente a los métodos convencionales de extracción, al aumentar la recuperación de polifenoles (Rodríguez-Pérez et al. 2015; Vázquez et al. 2014; Cai et al. 2016), además de permitir la reducción en el tiempo del proceso (Pan et al. 2012). Lo anterior se atribuye al hecho de que el uso de ultrasonido favorece la ruptura de la pared celular, con el consiguiente aumento de la penetración del disolvente.

Con respecto a la comparación de la EAU frente a los métodos no convencionales Ledesma-escobar & Priego-Capote (2015) indicaron que la EAU presentó un mayor porcentaje de

recuperación de polifenoles a partir de limón, en comparación con la extracción asistida por microondas (EAM), en particular para la neohesperidina (16%) y el eriodictiol (13%). Estos resultados también indicaron que la EAU fue más rápida, ya que el proceso empleó sólo 5 min, en comparación con 10.8 min para el EAM. De acuerdo a Rodríguez-Rojo et al. (2012), la mejora observada para la EAU se debe a que esta técnica favorece el transporte del disolvente interno por disrupción de las células a través de la cavitación. Yildiz-Ozturk et al. (2015), también realizaron la comparación entre EAM y EAU durante la extracción de polifenoles de hojas de Stevia (*S. rebaudiana*), indicando que los polifenoles recuperados por EAU mostraron un mejor actividad antioxidante. Por el contrario M'hiri et al. (2015) reportaron una disminución de la actividad antioxidante del extracto polifenólico de las cáscaras de naranja, lo cual, atribuyeron a que el ultrasonido pudo inducir la formación de radicales libres en el medio líquido que pudieran conducir a reacciones sonoquímicas, provocando oxidación y degradación de los compuestos. Por lo tanto, estos resultados concluyeron que la potencia ultrasónica moderada (100 a 125 W) permite una extracción eficiente con alta actividad antioxidante.

3.4. Utilización de materias primas renovables para la obtención de polifenoles

La creciente industrialización de los productos agroalimentarios, especialmente los procedentes de fuentes vegetales, generan subproductos como cáscaras, bagazo y/o semillas que son considerados residuos agroindustriales los cuales, pueden constituir del 20 al 50% del peso total del material vegetal (Goula et al. 2016; Dahmoune et al. 2013). La falta de disposición final en conjunto a la inadecuada gestión de estos residuos, ha promovido la búsqueda del aprovechamiento, a través de la extracción de compuestos fitoquímicos con el objetivo de darles un valor agregado, buscando además, la reducción de los impactos ambientales que pudieran ocasionar (Barba et al. 2016).

Por lo anterior, diversos autores han propuesto el aprovechamiento de residuos agroindustriales para la obtención de polifenoles, debido a que estos compuestos se pueden encontrar incluso en mayor abundancia en las cáscaras y semillas que en la porción comestible del material vegetal, (Rabelo et al. 2016) como sucede en los frutos cítricos incluyendo el limón, naranja y pomelo (Balasundram 2006).

3.5. Aprovechamiento de residuos de limón para la obtención de polifenoles

El limón es considerado un fruto promotor de la salud, al ser una fuente vitaminas, minerales, fibra dietética, aceites esenciales, carotenoides y de polifenoles, cuya presencia y concentración dependen de la variedad y sección del fruto (Moreno 2010).

Entre los ácidos fenólicos reportados en las cáscara de limón (*Citrus limon Bur*) se encuentran los ácidos hidroxicinámicos como: el ácido cafeico (80.0 µg/g bs), el clorogénico (179 µg/g bs), el ferúlico (59.1 µg/g bs), el sinápico (59.6 µg/g bs) y el ácido p-cumárico (264.0 µg/g bs) (Wang et al. 2008; Cao et al. 2015).

Diversos autores señalan que gran parte de las propiedades benéficas de los frutos cítricos se atribuyen a la presencia de compuestos flavonoides (Porrás et al. 2004; Barreca et al. 2011), principalmente a las flavonas y a las flavanonas, ubicadas en el flavedo y el albedo del fruto (Vallejo & Toma 2014). Entre los principales flavonoides reportados en el limón se encuentran: la eriocitrina, neoeriocitrina, naringina, diosmina, hesperidina y neohesperidina (Tripoli et al. 2007; Zhao et al. 2015), siendo la hesperidina y eriocitrina los flavonoides de mayor abundancia (Peterson et al. 2006; Barreca et al. 2011). La primera, es una flavanona reportada en todos los órganos del limón (flavelo, albedo y pulpa), cuya concentración puede alcanzar hasta los 94 mg/g bs, mientras que la eriocitrina, es una flavona ubicada en las cáscaras y semillas del limón (Huang & Ho 2010; Porrás et al. 2004).

3.5.1. Actividad antioxidante de polifenoles procedentes de cítricos

El ser humano se ve afectado por radicales libres presentes tanto en el interior del cuerpo como en el entorno, particularmente por las especies reactivas de oxígeno (ERO's). Entre las principales ERO's reportadas se encuentra el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (OH), el ion hipoclorito (ClO^-), el dióxido de nitrógeno (NO_2) y el peroxinitrito (ONOO), el óxido lipídico y los radicales peroxilo (RO-, ROO-), producidos durante la auto-oxidación de ácidos grasos poliinsaturados. Estas especies son las responsables de generar estrés oxidativo, provocando la activación inadvertida de enzimas y daño oxidativo a las macromoléculas celulares, conduciendo a diversos trastornos de salud, incluyendo enfermedades cardiovasculares, inflamatorias, envejecimiento, diabetes mellitus, enfermedades neurodegenerativas y cancerígenas (Ngo et al. 2015).

Una de las características que distinguen a los polifenoles, y en particular a los flavonoides, es justamente su capacidad para reducir ERO's, al actuar como "eliminadores de radicales", evitando el daño oxidativo que pudieran causar a las biomoléculas del huésped (Kamran & Dangles 2014). Esta actividad se encuentra fuertemente influenciada por la estructura química de los compuestos, en particular por la presencia de tres grupos funcionales en la molécula. La primera se asocia como la estructura orto-dihidroxi (catecol) en el anillo B, la cual le confiere una mayor estabilidad a los radicales aroxilo, posiblemente por enlaces de hidrógeno, y que participa en la dislocación de electrones. La segunda se asocia con el enlace 2,3-doble, en conjugación con una función 4-oxo, responsable de la dislocación del electrón del anillo B; mientras que la tercera se debe la presencia de los grupos 3- (a) y 5- (b) -hidroxilo (figura 6) (Tripoli et al. 2007).

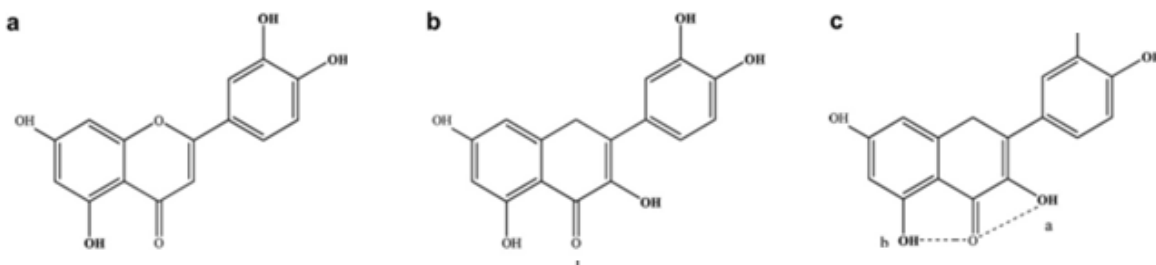


Figura 6 Grupos funcionales en la estructura flavonoide con alta capacidad antioxidante (Tripoli et al. 2007).

3.5.2. Actividad antimicrobiana de polifenoles procedentes de cítricos

La expansión de enfermedades transmitidas por microorganismos patógenos alimentarios, en conjunto con las restricciones en cuanto al uso de agentes antimicrobianos de origen sintético, ha impulsado la búsqueda de compuestos obtenidos de fuentes naturales, cuyo potencial biológico les permita sustituir a los aditivos convencionalmente utilizados. Una estrategia de innovación para atender a esta problemática sería a través de la aplicación de compuestos flavonoides como agentes antibacterianos de origen natural, debido a que han demostrado actividad frente a un gran espectro de microorganismos patógenos como: *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* y *Stenotrophomonas maltophilia* (Cushnie & Lamb 2005; Otang & Afolayan 2016).

La actividad antimicrobiana de los flavonoides ha sido asociada a 3 mecanismos diferentes: el primero puede ser mediante daños a la membrana citoplasmática como consecuencia de la perforación y/o reducción de la fluidez de la membrana. El segundo puede ser a través de la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos, causada por la inhibición de la topoisomerasa, mientras que el tercero sería mediante la inhibición del metabolismo energético debido a la inhibición de NADH-citocromo C reductasa (Cushnie & Lamb 2011).

Al igual que en la actividad antioxidante, la actividad antimicrobiana de los polifenoles ha sido asociada con la estructura química que presentan, en especial por la presencia de sustituyentes hidroxilos en la posición 2, 4 o 2, 6 del anillo B y 5,7 en el anillo A (Cushnie & Lamb 2005).

3.6. Estrategias para mejorar la baja estabilidad y biodisponibilidad de los polifenoles

Una de las principales limitantes en la aplicación de los polifenoles es que su actividad biológica puede ser afectada por diversos factores ambientales, ya que son altamente susceptibles a la luz, a temperaturas elevadas (>50 °C) y a cambios de pH. Además, de que la mayoría de ellos son poco solubles en agua y presentan baja estabilidad gastrointestinal, resultando en bajas tasas de absorción (Parisi et al. 2014).

La baja absorción de los polifenoles se debe al mecanismo de transporte por el cual atraviesan en el epitelio (figura 7). Este mecanismo se basa en la difusión pasiva, en donde, después de ser absorbidos, los polifenoles sufren procesos de eflujo activo, por lo cual la mayoría de ellos son bombeados de nuevo al lumen (Li et al. 2015).

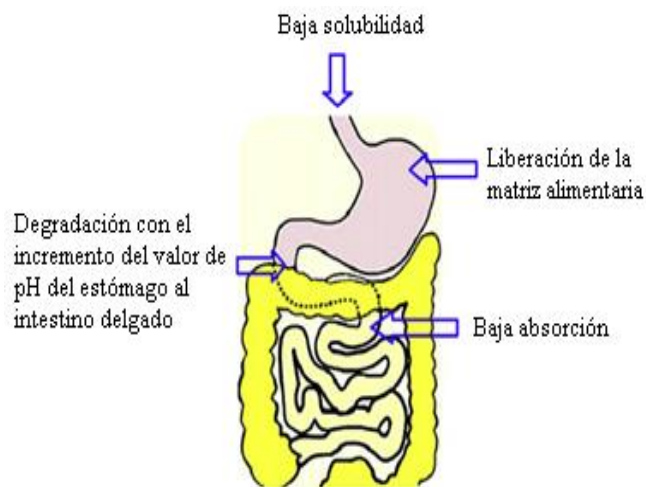


Figura 7. Factores que influyen en la baja biodisponibilidad de los polifenoles (Li et al. 2015).

Lo anterior ha dado lugar al uso de nanopartículas (Nps) como mecanismo de protección, para mejorar la solubilidad de los compuestos polifenólicos, mediante la interacción de los polifenoles con los sitios hidrofóbicos de las Nps, disminuyendo, además, el riesgo de la oxidación/degradación en el tracto gastrointestinal. Otro aspecto importante es que la nano-encapsulación permite además, aumentar significativamente la absorción y biodisponibilidad, debido a que las Nps pueden ser captadas por las células epiteliales directamente en el intestino delgado (Li et al. 2015).

Recientemente, las Nps alimentarias han sido utilizadas extensamente para la encapsulación de polifenoles (figura 8). Pueden estar basadas en lípidos, proteínas (principalmente β -lactoglobulina, caseína, gelatinas), polisacáridos (tales como quitosano, alginato de sodio y almidón), o bien por una combinación de proteína-polisacárido (Faridi & Mahdi 2016).

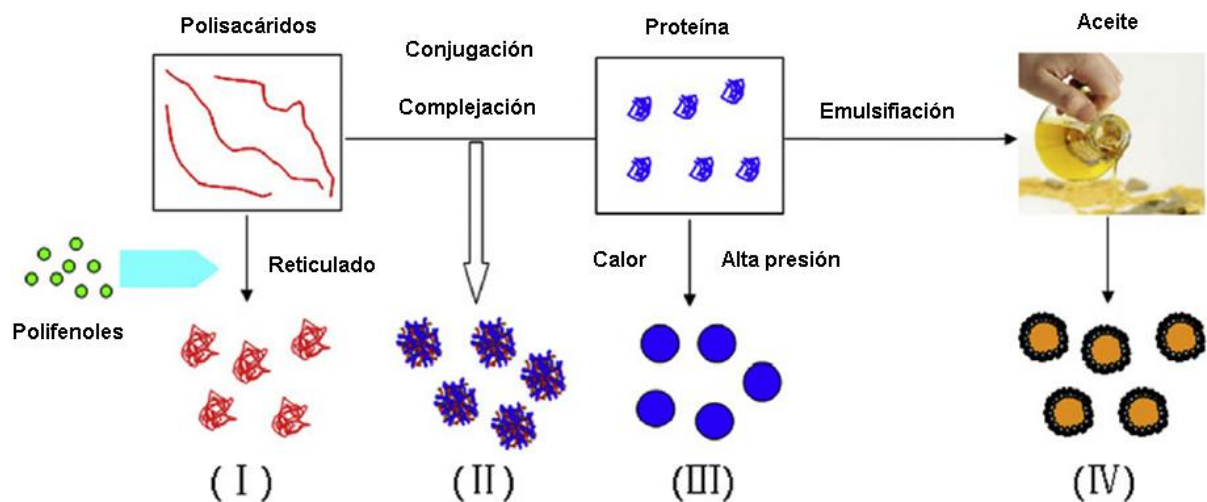


Figura 8. Biomoléculas basadas para la encapsulación y liberación de polifenoles (I): nanocomplejos polisacáridos; II: nanopartículas conjugadas; III, nanopartículas de proteínas; IV, nanopartículas sólidas de lípidos (Hu et al. 2016).

Las Nps elaboradas a partir de polisacáridos han sido ampliamente empleadas, debido a sus propiedades de bioadhesividad, especialmente en las superficies mucosas, ayudando a prolongar el tiempo de residencia de los polifenoles en el intestino (Harris et al. 2011). Dentro de la gran variedad de polisacáridos, el quitosano resulta ser una excelente alternativa para la encapsulación y entrega de diversos nutrientes, gracias a su naturaleza catiónica en condiciones ácidas, que le proporciona simplicidad para fabricar diversos sistemas de encapsulación,

incluyendo nano/micro partículas, perlas de hidrogel, emulsiones, fibras, películas y membranas (Luo & Wang 2013).

3.7. Biopolímeros: quitina y quitosano

La biosíntesis de macromoléculas mediante polimerizaciones enzimáticas, bacterianas y químicas ha dado lugar a polímeros naturales como la celulosa, el colágeno y la quitina, que resultan ser esenciales para la sostenibilidad de los organismos, como alimento y fuente de energía (Belgacem & Gandini 2008).

La quitina es un biopolímero estructural, que tiene un papel análogo al del colágeno en los animales superiores y la celulosa en las plantas terrestres. Puede considerarse como una estructura de celulosa con un hidroxilo en la posición C-2 sustituido por un grupo acetoamido que puede encontrarse en tres formas polimórficas diferentes (figura 9) (Pillai et al. 2009). La primera presenta una disposición favorable para la formación de fuertes interacciones moleculares de puentes de hidrógeno, por lo que es la más estable y de mayor abundancia de los tres polimorfos. Mientras que la β -quitina se encuentra compactada en arreglos paralelos llevando a debilitar las fuerzas intermoleculares. Finalmente, la γ -quitina, es la de menor abundancia, presentando un arreglo paralelo y antiparalelo, por lo que es considerada como la combinación de las estructuras α y β (Kurita 2001; Sagheer et al. 2009). Estas estructuras pueden ser caracterizadas mediante el uso de diferentes técnicas como la difracción de rayos-X y espectroscopia infrarroja (Belgacem & Gandini 2008).

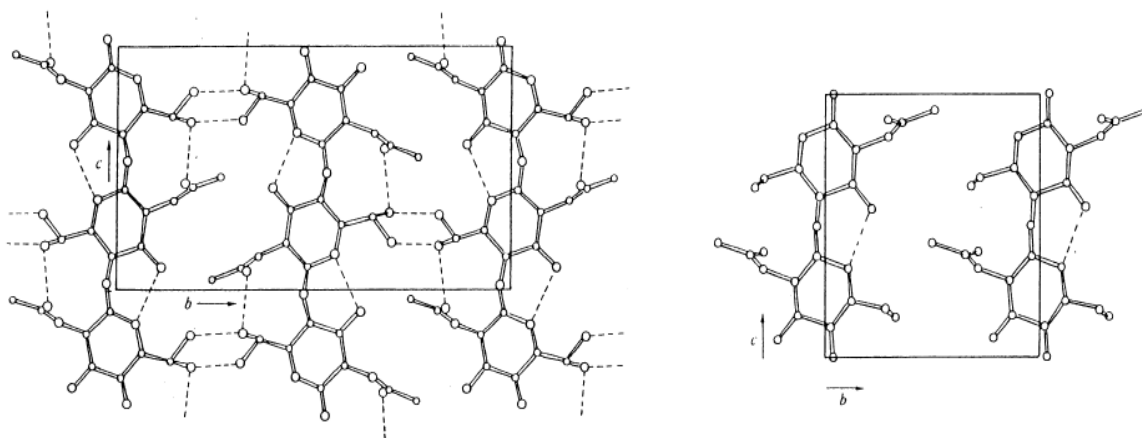


Figura 9. Conformación química de las moléculas de α - quitina (Izquierda) y β -quitina (derecha) (Kurita 2001).

3.7.1. Fuente de obtención de quitina

La quitina ha sido aislada a partir de los esqueletos exteriores de crustáceos, moluscos, insectos y ciertos hongos. En la tabla 3 se presentan las principales fuentes de obtención de quitina reportadas por Hamed et al. (2016) indicando el rendimiento obtenido a partir de cada materia prima.

Tabla 3. Comparación del contenido de las principales fuentes de obtención de quitina (Hamed et al. 2016).

Organismo	Contenido (Quitina %)
Crustáceos	
<i>Nephro</i> (langosta)	69.8
<i>Euphausia superb</i> (krill)	24
<i>Homarus</i> (langosta)	60-75
<i>Crangon</i> (Camarón)	17.8
<i>Lepas</i> (barrena de ganso)	58.3
<i>Chionoecetes opilio</i> (Cangrejo)	26.6
Insectos	
<i>Blatella</i> (cucaracha)	18.4
<i>Coleópteros</i> (mariquita)	27-35
<i>Diptera</i>	54.8
<i>Pieris</i> (mariposa)	64.0
<i>Bombyx</i> (gusano de seda)	44.2
<i>Galleria</i> (gusano de cera)	33.7
Hongos	
<i>Aspergillus niger</i>	42.0
<i>Penicillium notatum</i>	18.5
<i>Penicillium chrysogenum</i>	19.5-42
<i>Saccharomyces gutulata</i>	2.3
<i>Mucor rouxii</i>	9.4
Moluscos	
Calamares, sepias, pulpos	6-40

Comercialmente, los residuos de camarón son considerados las principales fuentes de quitina (Leharne et al. 2011), debido a que la creciente demanda del procesamiento de este producto, principalmente en países tropicales y subtropicales (Nidheesh et al. 2015; Ghorbel-bellaaj et al. 2012). Diversos autores señalan que los residuos de camarón representan una excelente alternativa para la extracción de quitina, cuyos rendimientos de obtención pueden superar el 20 % con respecto a la materia prima (Samar et al. 2013; Teli & Sheikh 2012). Entre las especies de camarón reportadas para la obtención de quitina y quitosano se encuentran: *Penaeus semisulcatus*, *Metapenaeus affinis* (Sagheer et al. 2009), *Parapenaeus longirostris* (Limem et al. 2016), *Penaeus vannamei* (Ngo et al. 2015), *Metapenaeus monoceros* (Ghorbel-bellaaj et al. 2012), *Pandalus borealis* (Rødde et al. 2008) y *Crangon* (Bajaj et al. 2011).

3.7.2. Métodos de extracción de quitina

Es importante considerar que los crustáceos presentan además de quitina otros componentes como proteínas, carbonato de calcio y pigmentos de naturaleza lipídica (carotenoides), que son necesarios eliminar, por lo que se han desarrollado diversas técnicas de extracción basadas en reacciones químicas y por medio de tratamientos biológicos (Leharne et al. 2011).

El método químico convencional es el más utilizado industrialmente, sin embargo, presenta la desventaja de ser costoso, perjudicial para el ambiente, además de afectar negativamente a las propiedades fisicoquímicas de la quitina, así como a las proteínas y minerales eliminados, que pudieran ser aprovechados por su potencial biológico. Por otro lado, la extracción biológica puede ser considerada como un tratamiento más seguro para la recuperación de la quitina, pero hasta la fecha, se ha limitado los estudios a nivel laboratorio debido a las dificultades para escalar el procedimiento (Hamed et al. 2016).

3.8. Quitosano

La utilización de la quitina ha sido restringida a causa de su baja solubilidad, ligada a su estructura semi-cristalina (Pillai et al. 2009). Por lo tanto, se han realizado modificaciones químicas en su estructura con la finalidad de obtener un biopolímero más versátil, como el quitosano, un biopolímero constituido por unidades de β -(1-4) 2-acetamido-2-deoxi- β -D-glucopiranososa y 2-amino-2-deoxi- β -D-glucopiranososa. El quitosano es producto del proceso de N-desacetilación de la quitina, en donde los grupos acetilo son sustituidos por grupos amino en la posición C-2 de la cadena carbonada (figura 10) (Kurita 2001).

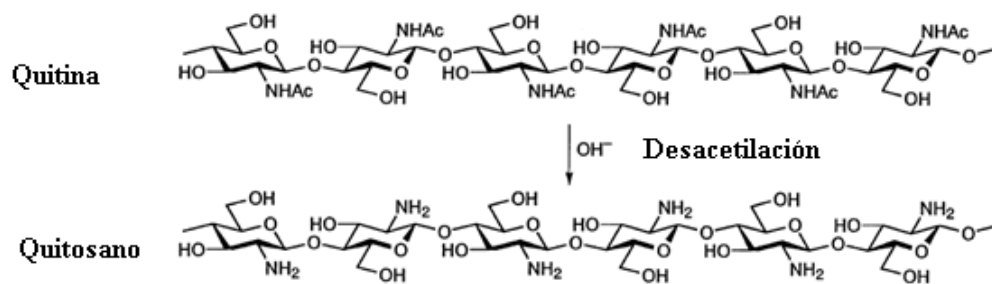


Figura 10. Estructura química de quitina y quitosano (Kurita 2001).

3.9. Métodos de obtención de quitosano

A continuación, se presenta una descripción de los principales métodos de desacetilación de quitina reportados en la literatura:

3.9.1. Método químico convencional

El exoesqueleto de camarón contiene aproximadamente 25-40% de minerales, constituidos principalmente por carbonato de calcio y fosfato de calcio. La eliminación de estos minerales se lleva a cabo mediante un proceso de desmineralización, en donde estos compuestos son hidrolizados en sales altamente solubles en agua, que pueden separarse por filtración y lavado con agua desionizada (Abdel-rahman et al. 2015). Para ello es necesario realizar un tratamiento ácido de los residuos, empleando diversos ácidos orgánicos como el ácido fórmico, acético, láctico, ascórbico, succínico y el ácido málico; así como con ácidos inorgánicos como el sulfúrico, nítrico, fosfórico y el clorhídrico, siendo este último el más empleado en los procesos industriales debido a su disponibilidad general y alta eficiencia. (Bajaj et al. 2011).

Después de la desmineralización, es necesario realizar un proceso de desproteínización con el objetivo de eliminar las proteínas, lípidos y pigmentos de los crustáceos. En esta etapa, se emplea un tratamiento alcalino para destruir los enlaces químicos covalentes mediante la hidrólisis de los grupos acetilo para transformar las unidades N-acetil-D-glucosamina en unidades D-glucosamina con grupos -NH₂ libres (Abdel-rahman et al. 2015; Hamed et al. 2016). Para la desproteínización, se han empleado compuestos alcalinos tales como KOH, Na₂CO₃, NaHCO₃, K₂CO₃, Ca(OH)₂, Na₂S, CaHSO₃ y Na₃PO₄ pero el tratamiento con NaOH es el más utilizado. Durante esta etapa deben considerarse diversos factores que pueden influir en la calidad de la quitosano, como la concentración de álcali, la relación álcali/materia prima, tiempo de incubación y temperatura (Bajaj et al. 2011).

3.9.2. Método enzimático

La desacetilación de la quitina puede llevarse a cabo mediante la actividad enzimática de quitin-desacetilasa. Esta enzima se ha reportado en las paredes celulares de algunos hongos, bacterias y algunos insectos. A pesar de ser un método amigable con el ambiente, su principal inconveniente es el bajo rendimiento de cepas productoras de desacetilasa a partir de hongos, así como la baja actividad enzimática y requerimientos de fermentación complicados, sin embargo, se ha reportado que las bacterias que producen quitina desacetilasa pueden crecer en sistemas de fermentación más fácil y rápidamente, en comparación con los hongos, por lo que pueden considerarse como una alternativa para la obtención de quitosano (Hamed et al. 2016).

3.9.3. Método asistido por ultrasonido

Debido a las limitantes que presenta el proceso convencional de desacetilación, se han aplicado diversas tecnologías de innovación, como la aplicación de ciclos de congelación-bombeo-descongelación, la irradiación gamma, y la desacetilación asistida por microondas y por ultrasonido; siendo esta última, una tecnología simple, viable y amigable con el medio ambiente (Thi, Duong & Nghia 2017).

La desacetilación asistida por ultrasonido ha sido reportada por Birolli et al. (2016) como un proceso eficiente para producir quitosano procedente de camarón gigante (*Macrobrachium rosenbergii*), a partir del tratamiento alcalino de α -quitina con irradiación de ultrasonido de alta intensidad. Estudios similares han sido reportados por Thi, Duong, & Nghia (2017), quienes realizaron la desacetilación de quitina empleando un baño de ultrasonido, a partir de camarón blanco (*Penaeus vannamei*), al igual que Limem et al. (2016), quienes reportaron un porcentaje de desacetilación del 83.55% a partir de residuos de camarón (*Parapenaeus longirostris*). Por su parte Fiamingo et al (2016) realizaron la desacetilación asistida por ultrasonido empleando una sonda, a partir de β - quitina extraída de calamar (*Teuthis* spp). Estos autores demostraron que ultrasonido representó un proceso más eficiente que el proceso convencional, debido a los efectos de irradiación y sonicación.

3.10. Propiedades fisicoquímicas del quitosano

La identidad fisicoquímica del quitosano se encuentra estrechamente ligado con el grado de acetilación (DA) y el peso molecular, debido a que estos parámetros influyen directamente en

su solubilidad, pKa, viscosidad, capacidad de gelificación, sus propiedades biológicas y funcionales (Domard 2011).

3.10.1. Grado de acetilación del quitosano

El DA es un parámetro empleado para diferenciar entre quitina y quitosano, a partir de la determinación del contenido de grupos amino libres en ambos polímeros. Se define como la fracción o porcentaje de unidades glicosídicas N-acetiladas (Khan et al. 2002; Belgacem & Gandini 2008) y debido a su importancia, se han establecido diversos métodos para realizar su determinación. En la tabla 4 se presentan los principales métodos reportados para la determinación del DA.

Tabla 4. Métodos de caracterización para la determinación del DA en quitosano (Khan et al. 2002; Belgacem & Gandini 2008)

Método	Condiciones Analíticas	Características
Espectroscopia de Resonancia magnética nuclear de protón (RMN- H^1)	Muestras de quitosano disueltas en D_2O (pH 3 - 4) a 90 °C	Intensidad de las señales del protón del metil-(1-4) 2 acetomido-2-dexoxy- β -D-glucano, tomando como referencia de los protones H-2 al H-6
Método enzimático	El quitosano es disuelto en ácido acético al 0.2% y es incubado con 5 unidades de exo- β -D-glucosaminidasa, β -N-acetilhexosaminidasa y quitosanas durante 12 h a 40 °C	Las cantidades liberadas de glucosamina y monosacáridos de N-acetil glucosamina son determinadas mediante un método colorimétrico
Espectrometría infrarroja por Transformadas de Fourier (FTIR)	Las muestras de quitosano son mezcladas con KBr	Conjuntos de bandas de medición y de referencia determinadas previamente por espectroscopia de RMN y Ultravioleta-Visible (UV)
Análisis térmico	Polvo analizado directamente	Basado en la entalpía de degradación de la muestra
Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	Muestra hidrolizada con H_2SO_4 2.41 M	Basado en la determinación de grupos acetilo liberados

En la actualidad, la espectroscopia de RMN- H^1 es considerada la técnica más conveniente para determinar el contenido de grupos acetilo en muestras solubles. En la figura 11 se presenta un

espectro de RMN- H^1 característico del quitosano disuelto en D_2O y DCl , en donde la señal a 1.95 ppm permite la determinación del contenido de acetilo por referencia a la señal a 4.79 ppm para el residuo D-glucosamina y a 4.50 ppm para la unidad N-acetil-D-glucosamina (Khan et al. 2002; Belgacem & Gandini 2008).

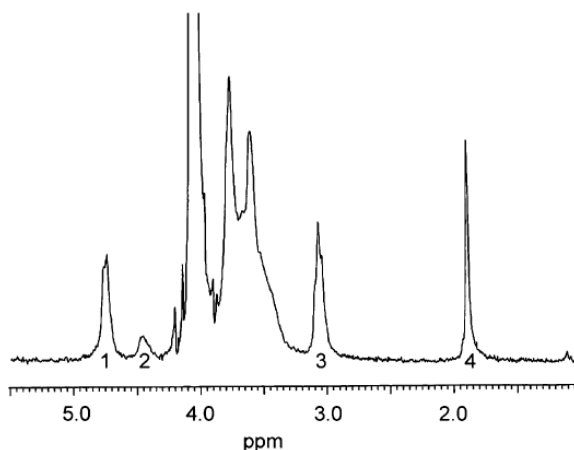


Figura 11. Espectro de RMN- H^1 correspondiente a una muestra de quitosano disuelto en D_2O , pH= 4, T= 85 °C, concentración 5 g/L. Los picos codificados se atribuyen a: (1) H-1 de glucosamina, (2) H-1 de N-acetil-glucosamina, (3) H-2, (4) protones del grupo acetil de N-acetil-glucosamina (Rinaudo 2006).

El porcentaje de DA puede ser calculado a partir de la relación de la intensidad (I) de las señales del protón del metil-(1-4)2 acetomido-2-dexoxy- β -D-glucano y la referencia de los protones H-2 al H-6 a través de la siguiente ecuación Hirai *et al.* (1991):

$$DA(\%) = \frac{\frac{1}{3} I_{CH_3}}{\frac{1}{6} H_2 - H_6} \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

3.10.2. Peso molecular del quitosano

El PM y la distribución de los grupos acetilo a lo largo de la cadena (aleatoria o en bloques) pueden afectar las características fisicoquímicas del quitosano, tales como la solubilidad y también a las interacciones inter-cadena debido a la presencia de enlaces hidrógeno y al carácter hidrofóbico del grupo acetilo (Rinaudo 2006). Se ha reportado que el PM promedio de la quitina es de 1.03×10^6 a 2.5×10^6 g/mol, mientras que la reacción de N-desacetilación reduce este peso a 1×10^5 a 5×10^5 g/mol (Kumar 2000).

Los principales métodos utilizados para determinar el PM son: la reología y la cromatografía de exclusión de tamaño (SEC, por sus siglas en inglés) de alto rendimiento. La primera es considerada como un método simple y rápido, en donde la determinación del PM se relaciona con la viscosidad intrínseca $[\eta]$ mediante la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada (Leharne et al. 2011):

$$[\eta] = KM^a \text{ Ecuación 2}$$

Por otro lado, la técnica SEC-HPLC permite no sólo la determinación del PM, sino también su distribución estadística, por lo tanto, el índice de polidispersidad. La separación de las especies tiene lugar en función al tamaño molecular, o más estrictamente a su volumen hidrodinámico, en donde la cantidad de polímero que eluye a un tiempo o volumen de retención dado, puede cuantificarse mediante el acoplamiento de un detector de índice de refracción al sistema (Belgacem & Gandini 2008).

3.10.3. Solubilidad del quitosano

La solubilidad del quitosano está relacionada con el %DA, la concentración iónica, el pH, la distribución de los grupos acetilo a lo largo de la cadena, así como las condiciones de purificación y secado del polisacárido. Este parámetro suele evaluarse mediante la disolución del quitosano en una solución de ácido acético al 1% o 0.1 M, aunque también pueden emplearse otros ácidos orgánicos como el fórmico, láctico, pirúvico y ácidos oxálicos. De igual manera, se ha reportado la solubilidad de quitosano en ácidos minerales como el ácido hidroc্লórico y el ácido nítrico (Rinaudo 2006).

3.10.4. Actividad antioxidante del quitosano

El quitosano ha sido reconocido por su capacidad antioxidante, lo que significa que son capaces de secuestrar radicales libres. El mecanismo involucrado está relacionado con el hecho de que los radicales libres pueden reaccionar con el ion amonio (NH^{+3}) de las cadenas del quitosano para formar una molécula estable (Limem et al. 2016).

La actividad antioxidante del quitosano puede ser evaluada a través de la capacidad de eliminación de los radicales libres de 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH), o bien mediante el ensayo de descoloración del radical ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS) (Wang et al. 2013).

3.10.5. Actividad antimicrobiana del quitosano

La actividad antimicrobiana del quitosano ha sido demostrada frente cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Vibrio cholerae*, *Shigella dysenteriae*, *Prevotella melaninogenica* y *Bacteroides fragilis*, *Candida glabrata*, *Candida albicans*, *Candida parapsilensis* y *Candida kreusei* (Teli & Sheikh 2012; Benhabiles et al. 2012; Madureira et al. 2015).

Esta actividad puede ser afectada por factores intrínsecos como el PM y el DA del polímero. Por lo general, el quitosano con menor DA presenta mayor actividad antibacteriana, debido a que tiene una mayor carga positiva (Luo & Wang 2013). Mientras que el PM influye sobre la flexibilidad de los grupos funcionales, que pueden reaccionar con las células microbianas (Luo & Wang 2013).

Con respecto a la influencia de los factores extrínsecos, podemos mencionar el efecto del pH, la fuerza iónica del medio y la naturaleza del microorganismo. Generalmente, la actividad antimicrobiana de quitosano es mayor a valores bajos de pH, debido a que los grupos amino de quitosano se ionizan a un pH inferior a 6, lo que induce la protonación de los grupos amino (Hosseinnejad & Mahdi 2016).

3.11. Aplicaciones del quitosano

La versatilidad del quitosano, en conjunto con su alta biocompatibilidad, biodegradabilidad y potencial biológico, han sido factores claves para aplicación de este polímero en diversas áreas de estudio, las cuales se presentan a continuación en el figura 12 (Harris et al. 2011).

De las áreas de aplicación presentadas en la figura 12, nos enfocaremos a la aplicación de conservación de alimentos, mediante el desarrollo de sistemas de encapsulación empleando nanopartículas (Nps) de quitosano, las cuales han sido utilizadas extensamente para la encapsulación de compuestos bioactivos, debido principalmente a que pueden presentar tamaños en el orden de 10 a 1000 nm (Ramezani et al. 2015). Lo anterior permite que las Nps puedan ser explotadas a través de diferentes vías incluyendo la administración intravenosa y oral, puesto que pueden penetrar fácilmente los tejidos capilares y epiteliales, permitiendo la entrega eficiente de las sustancias bioactivas hacia sitios dirigidos en el cuerpo (Zhang & Zhao 2015).

La principal ventaja del uso y empleo de Nps de quitosano es que pueden exhibir actividad antibacteriana más alta que el quitosano en polvo, gracias a la mayor densidad de carga y área superficial (Lange et al., 2014; Mohammadi, Hashemi, & Masoud, 2016).

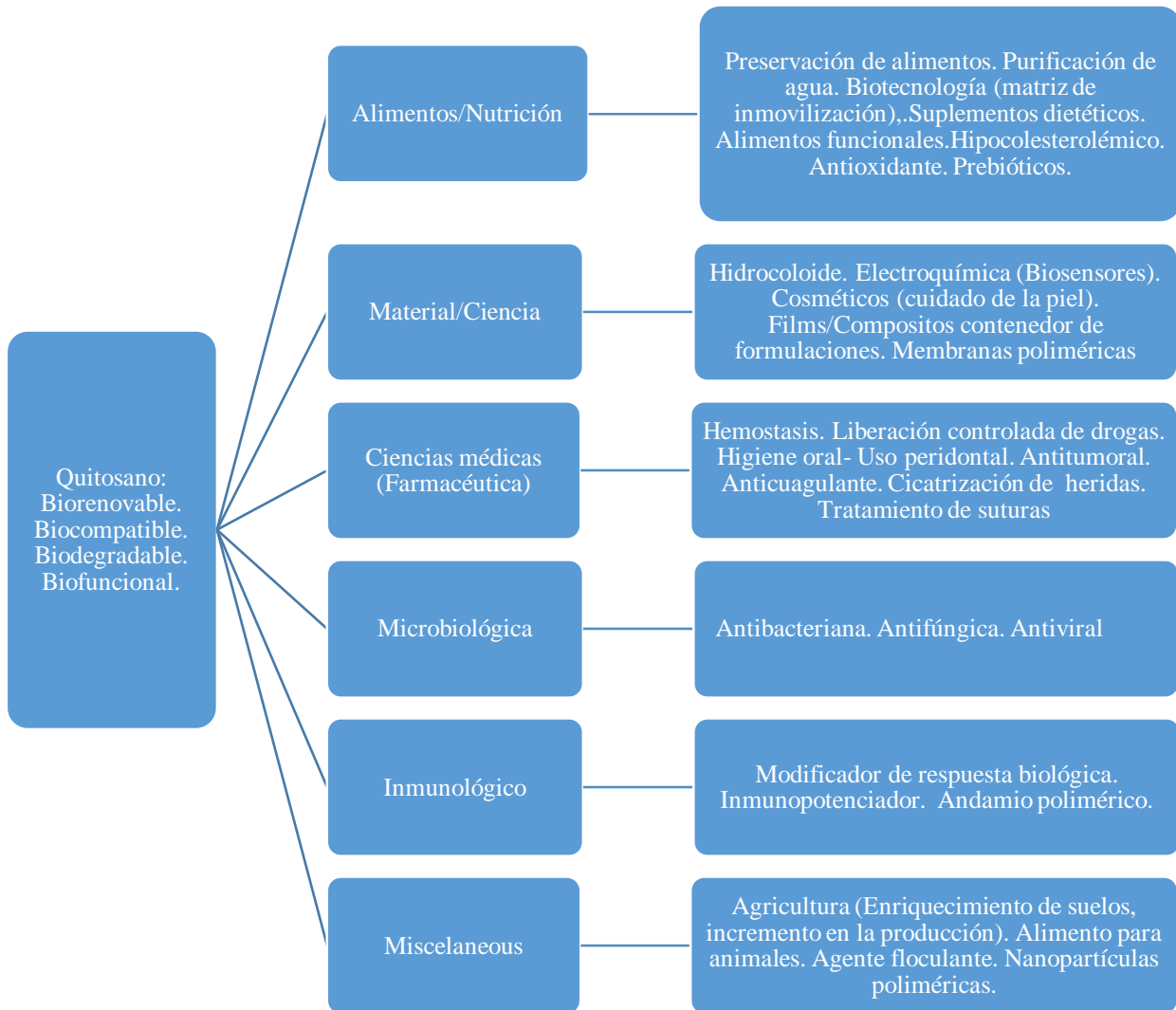


Figura 12. Principales aplicaciones reportadas para el uso de quitosano (Prashanth & Tharanathan 2007).

3.12. Quitosano empleado para la encapsulación de compuestos activos

Existen diferentes métodos para producir partículas de quitosano. La elección del método influirá en aspectos como el tamaño de partícula, la reproducibilidad de los perfiles cinéticos de

liberación, así como la estabilidad química y térmica del producto final. A continuación, se presentará un listado de los principales métodos de preparación reportados.

3.12.1. Coacervación o precipitación

Este método se basa en la baja solubilidad del quitosano en medios alcalinos. Para la obtención del coacervado se añade la solución de quitosano en una solución alcalina por ejemplo hidróxido de sodio, hidróxido de sodio/metanol o etano-diamina mediante una boquilla de aire comprimido. El tamaño puede ser controlado modulando el diámetro de la boquilla de presión de aire (Madureira et al. 2015).

3.12.2. Secado por aspersión

Es un proceso basado en el secado de partículas atomizadas en un flujo de aire caliente. Consiste en la atomización de una solución acuosa de quitosano, en conjunto con la solución bioactiva y el agente de reticulación apropiado, para formar partículas pequeñas, a partir de la evaporación del disolvente. Durante el proceso, es necesario controlar una serie de parámetros como el tamaño de la boquilla, la velocidad de flujo de rocío, la presión de atomización, la temperatura del aire de entrada y el grado de reticulación (Madureira et al. 2015).

3.12.3. Reticulación

El proceso de reticulación puede ser llevado a cabo mediante dos maneras diferentes: por reticulación química y por reticulación física. En la primera, las cadenas de quitosano son reticuladas para dar lugar a matrices bastante estables, unidas por enlaces covalentes, formadas por el uso de moléculas orgánicas, siendo el glutaraldehído, el agente reticulante más empleado, cuyo principal inconveniente es su elevada toxicidad (López-León et al. 2005; Delmar & Bianco-Peled 2015).

Por su parte, la reticulación física consiste en un proceso reversible, cuyas interacciones pueden llevarse cabo por interacción electrostática, tal y como sucede en la gelificación iónica, en donde la reticulación se basa en las interacciones de Coulomb entre las cadenas policationicas del quitosano y polianiones empleados como agentes de reticulación (Madureira et al. 2015).

La principal ventaja de la reticulación iónica es que permite el uso de agentes de baja toxicidad, (López-León et al. 2005), motivo por el cual esta tecnología ha ganado gran atención, al ser un

proceso simple de preparación, conveniente y controlable (Rázga et al. 2016) , debido a que las necesidades de energía son muy bajas, además de ser un proceso con alta compatibilidad con moléculas hidrófilas (Zorzi et al. 2015).

3.12.4. Gelificación iónica

Está basada en la transición sólido-gel del quitosano en presencia de polianiones con alta densidad de carga negativa, como los iones citrato, sulfato y fosfato (Zorzi et al. 2015). Actualmente, el Tripolifosfato de sodio (TPP) es el agente reticulante más empleado debido a las altas cargas netas negativas (que van de uno a cinco dependiendo del pH) por unidad monomérica (Sacco et al. 2016). La reticulación entre las cargas negativas y positivas del quitosano y el TPP dan lugar a un sistema termodinámicamente estable (figura 13) (Sarrate et al. 2013).

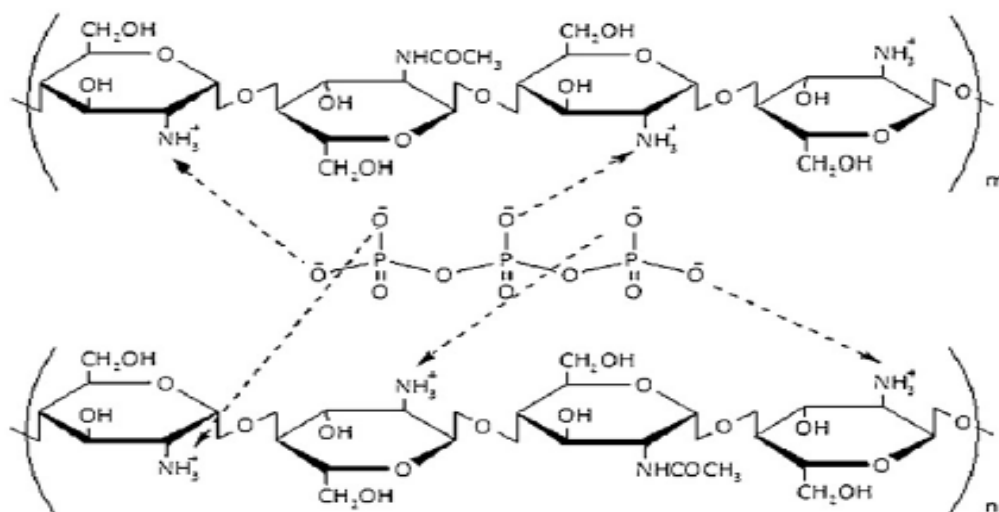


Figura 13. Interacción electrostática entre quitosano y TPP (Rázga et al. 2016).

En la figura 14 se presenta un esquema de las variables de mayor importancia involucradas en el proceso de gelificación iónica, incluyendo: (i) la concentración de quitosano y el agente reticulante; (ii) la relación de volumen entre el quitosano y el reticulante; (iii) la relación de peso quitosano y agente de reticulación; (iv) pH, (v) la fuerza iónica, y (vi) temperatura, aunque también es importante considerar los factores intrínsecos como el PM y el DA del quitosano (Zorzi et al. 2015; Gierszewska & Ostrowska-czubenko 2016; Gan et al. 2005; Lange et al. 2014; Madureira et al. 2016; Lamarra et al. 2016).

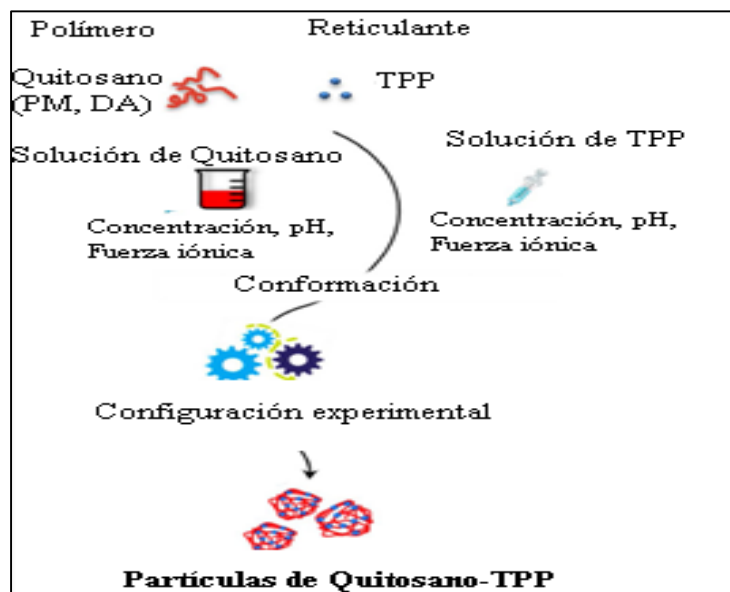


Figura 14 Principales variables involucradas en la formación de nanopartículas de quitosano por gelificación iónica (Rázga et al. 2016).

3.13. Encapsulación de polifenoles empleando nanopartículas de quitosano

Diversos autores reportan el uso de Nps de quitosano para la encapsulación de compuestos polifenólicos mediante el método de gelificación iónica. Entre los compuestos encapsulados podemos citar el ácido clorogénico con una eficiencia de encapsulación (E-Cap) del 48-59% (Nallamuthu et al. 2015), el ácido gálico con una E-Cap del 59-85% (Lamarra et al. 2016), el ácido ferúlico con E-Cap del 14.71-56.45 % (Panwar et al. 2016) y curcumina con E-Cap del 62.36-72.99% (Parize et al. 2012). La E-Cap de los compuestos polifenólicos ha sido atribuida a la interacción de los grupos amino de quitosano, que favorecen el atrapamiento de los compuestos de manera eficientemente (Madureira et al. 2016).

4. JUSTIFICACIÓN

La inadecuada gestión de los residuos generados por la creciente industrialización de productos agroalimentarios ha promovido la búsqueda para el aprovechamiento integral de los residuos, a fin de minimizar los impactos ambientales que pudieran ocasionar, a través de la extracción de compuestos bioactivos. Por lo anterior, diversos autores han propuesto el aprovechamiento de residuos agroindustriales para la obtención de polifenoles, debido a que estos compuestos se pueden encontrar incluso en mayor abundancia en las cáscaras y semillas, que en la porción comestible del material vegetal.

Dentro del contexto anterior, se planteó la valorización de las cáscaras, bagazo y semillas de limón persa (*Citrus latifolia*) para la extracción de compuestos polifenólicos y con ello generar subproductos de valor agregado. La elección del limón como materia prima de estudio se debió al hecho de que nuestro país, ocupa el primer lugar en producción a nivel mundial, superando las 2'000,000 de toneladas al año (Anon 2015). La extracción de polifenoles se realizó a través del estudio del efecto de ultrasonido, puesto que es considerada una tecnología de fácil manejo, segura, económica y reproducible, por la que ha sido reconocida como una alternativa sustentable con el medio ambiente, al reducir el uso de solventes tóxicos y disminuir el tiempo y energía del proceso.

Por otro lado, la expansión de enfermedades transmitidas por microorganismos patógenos alimentarios ha dado lugar al desarrollo de compuestos con potencial antimicrobiano, que sean capaces de sustituir a los aditivos convencionalmente utilizados, los cuales, se encuentran restringidos debido a que pueden ser nocivos para la salud. Ante este panorama, se propuso el presente estudio de investigación, dirigido al desarrollo nanopartículas de quitosano cargadas con polifenoles de limón persa (*Citrus latifolia*), cuya actividad antimicrobiana, combinada con su actividad antioxidante los convierten en agentes prometedores para extender la vida útil de los alimentos.

5. HIPÓTESIS

El efecto del ultrasonido favorecerá la eficiencia en la desacetilación de la quitina, así como la extracción y posterior encapsulación de los polifenoles de limón persa (*Citrus latifolia*) mediante el uso nanopartículas de quitosano, las cuales, permitirán preservar la actividad antibacteriana y antioxidante de los polifenoles encapsulados.

6. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del ultrasonido y de las variables intrínsecas al proceso de gelificación iónica, sobre la actividad antibacteriana y antioxidante de nanopartículas de quitosano cargadas con polifenoles de limón persa (*Citrus latifolia*).

6.1. Objetivos particulares

Analizar el efecto de las variables: concentración de etanol, amplitud de radiación, tiempo de sonicación y relación soluto-solvente, sobre el rendimiento de EAU de polifenoles de limón persa (*Citrus latifolia*), a través del estudio de metodología de respuesta.

Determinar la influencia de la concentración del hidróxido de sodio, amplitud de irradiación y del intervalo de sonicación sobre la eficiencia de la desacetilación asistida por ultrasonido, para la obtención de quitosano procedente del exoesqueletos de camarón blanco (*Litopenneaus vanamei*).

Estudiar los parámetros del proceso de gelificación iónica: pH, tiempo de agitación, la asistencia de ultrasonido, la concentración y relación de quitosano con el agente entrecruzante, durante la formación de partículas de quitosano, con el fin de evaluar el efecto sobre el tamaño, densidad de carga e índice de polidispersión.

Estudiar el efecto del tamaño, densidad de carga e índice de polidispersión de las nanopartículas de quitosano sobre la eficiencia de encapsulación y liberación de los polifenoles del extracto de limón persa.

Evaluar el efecto de la interacción entre las nanopartículas de quitosano con el extracto polifenólico de limón persa, sobre la actividad antibacteriana y antioxidante de los encapsulados formulados.

7. METODOLOGÍA

7.1 Estrategia experimental

En el presente estudio se evaluó el efecto del ultrasonido y de las variables intrínsecas al proceso de gelificación iónica, sobre la actividad antibacteriana y antioxidante de nanopartículas de quitosano cargadas con polifenoles de limón persa (*Citrus latifolia*). La estrategia experimental propuesta se dividió en cuatro etapas, planteando un objetivo particular en cada etapa realizada: 1) la extracción de polifenoles, 2) la obtención de quitosano, 3) la encapsulación de los polifenoles y 4) la caracterización de los compuestos encapsulados. El sistema de ultrasonido utilizado para la realización del estudio fue operado a 130 W y 20 kHz, acoplado a una sonda de 13 mm de diámetro.

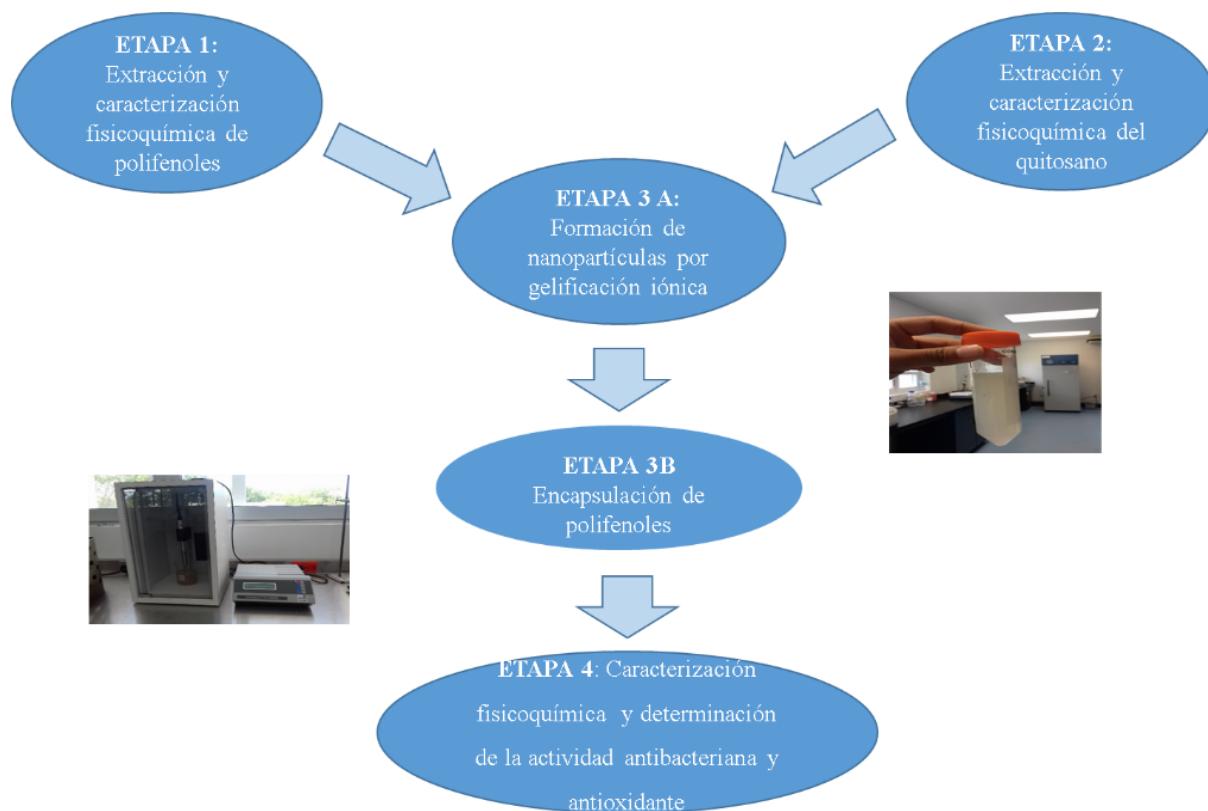


Figura 15. Estrategia experimental propuesta para la encapsulación de polifenoles de limón persa

7.2. Reactivos

Hidróxido de sodio (NaOH), ácido sulfúrico (H₂SO₄), fenol Folin-Ciocalteu, carbonato de sodio (NaCO₃), ácido gálico, ácido clorogénico, ácido cafeico, eriocitrina, ácido elágico, ácido p-

cumárico, ácido sinápico, diosmina, hesperidina, quercetina, ácido fórmico, metanol y acetonitrilo (calidad HPLC) Sigma Aldrich (San Luis, MI, EE.UU.). 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox), 2,2-Azinobis-3-etilbenzo-tiazolina-6-ácido sulfónico (ABTS), persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$), cloruro de sodio (NaCl), bifosfato de potasio (K_2HPO_4), bifosfato de sodio (Na_2HPO_4), cloruro de potasio (KCl), cloruro de p-yodonitrotetrazolio, ácido clorhídrico (HCl), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ácido bórico (H_3BO_3), indicador Shiro Tashiro, agua deuterada (D_2O), acetato de amonio ($C_2H_7NO_2$), quitosano (Sigma Aldrich, bajo peso molecular), tripolifosfato de sodio (TPP), cloruro de calcio ($CaCl_2$). Se preparó agua ultra pura en un sistema de filtración de agua Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EE.UU.). El caldo Mueller-Hinton, y el caldo nutriente se adquirieron con un distribuidor local y fueron de la marca BD Difco (Franklin Lakes, NJ, EE.UU.).

7.3. Etapa 1: Extracción de polifenoles asistida por ultrasonido

7.3.1. Material biológico para extracción de polifenoles

El muestreo del limón persa (*Citrus latifolia*) fue realizado en el municipio de Oxkutzcab, Yucatán en el mes de enero del 2016. Los frutos colectados fueron transportados al Centro de Investigación y Asistencia y Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), Unidad Sureste, en donde se realizó la separación de los aceites esenciales mediante un método mecánico (raspado). Posteriormente se realizó la molienda de los frutos en un molino industrial (Marca Siems Pulvex 200), separando el jugo de los residuos (cáscaras, bagazo y semillas) mediante un proceso de filtración. Los residuos colectados fueron resguardados a una temperatura de $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ antes del proceso de secado.

7.3.2. Obtención de harina de residuos de limón persa

Las cáscaras, bagazo y semillas fueron secados en un horno de convección eléctrica Jersa (No. 148-09) a una temperatura de $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}$ por un periodo de 16 h. Las muestras deshidratadas fueron procesadas en un molino industrial (Marca Siems Pulvex 200), para después ser tamizadas (tamaño del tamiz de $500\text{ }\mu\text{m}$) y finalmente obtener las harinas de limón persa, las cuales fueron resguardadas de la luz a una temperatura de $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Dzul 2014).

7.3.3. Caracterización fisicoquímica de la harina

7.3.3.1. Determinación de humedad

La determinación de humedad se realizó con base a la metodología descrita en la (NMX-F-428-1982 1982), pesando 0.500 g de muestra. El porcentaje de humedad se reportó mediante la lectura reportada la termobalanza marca Ohaus (Serie: MB45).

7.3.3.2. Determinación de actividad de agua

Este parámetro se determinó mediante un equipo de marca Novasina, utilizando una solución sobresaturada de carbonato de potasio para calibrarlo. La lectura de las muestras se realizó por triplicado.

7.3.3.3. Determinación de pH

La determinación de pH se llevó a cabo de acuerdo a lo establecido en la (NMX-F-317-S-1978 1978). Se pesaron 10 g de la muestra y se disolvieron en 50 mL de agua destilada. El valor del pH se reportó mediante la lectura obtenida del potenciómetro marca OAKLON.

7.3.3.4. Determinación de acidez titulable

Se realizó con base a la metodología de la NMX-F-102-S-1978. Para ello 100 g de la harina fueron solubilizadas en 500 mL de agua destilada. Después de filtrar, se tomaron alícuotas de 10 mL, adicionándoles 0.3 mL de fenolftaleína al 1% como indicador y se tituló con NaOH 0.0985 N (previamente valorado con H₂SO₄). El cálculo para determinar el porcentaje de acidez titulable, expresado como ácido cítrico, se realizó de acuerdo a la ecuación 3.

$$\% \text{ de acidez (g de ácido cítrico/100ml)} = \frac{V_{MX} \times C_{MX} \times \text{Factor} \times 100}{(C_{NaOH 0.1 M}) \times \text{Masa de la muestra}} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde:

V_{MX} = Volumen de gasto de la solución de NaOH estandarizada.

C_{MX} = Concentración de la solución de NaOH estandarizada.

$C_{NaOH 0.1M}$ = Concentración ideal de la solución de NaOH (0.1M)

Factor = Factor de conversión de equivalencia de 1 mL de NaOH 0.1M a ácido (cítrico: 0.006404).

7.3.3.5. Determinación de color

Se utilizó un colorímetro Mini Scan EZ (No. Serie: MSEZ 1505, EUA), a partir del cual se determinaron las coordenadas de color L* (negro/blanco), a* (verde/rojo) y b* (azul/amarillo), estos parámetros se calcularon como las lecturas promedio de tres determinaciones para cada muestra, las cuales se distribuyeron de manera uniforme en la celda. A partir de estos parámetros, se calcularon adicionalmente las coordenadas polares, denominando como croma (c*) al grado de saturación del color, y el ángulo hue o ángulo del tono. A continuación, se definen las ecuaciones de cada parámetro:

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \text{ Ecuación 4}$$

$$h = \arctan (b^* / a^*) \text{ Ecuación 5}$$

7.3.3.6. Determinación de sólidos solubles

La determinación de sólidos solubles se realizó empleando un refractómetro marca Atago (No. Serie: 0822706, Japón) usando un blanco de agua destilada, ajustando la escala a 1.33 (0° Brix). Las muestras fueron colocadas directamente sobre la celda y se efectuó la lectura por triplicado. A partir del valor del ° Brix se determinó el índice de madurez del fruto, de acuerdo a la ecuación 6:

$$\text{Índice de madurez} = \frac{\text{° Brix}}{\text{Acidez titulable}} \text{ Ecuación 6}$$

7.3.3.7. Determinación de cenizas

El porcentaje de cenizas o contenido de minerales (peso/peso) se determinó por el método estándar AOAC 942.05 (1995). Las harinas fueron pre-tratadas sometiéndolas a 90 °C por 5 h, hasta alcanzar peso constante. Posteriormente, las muestras (3 g) fueron colocadas en crisoles, los cuales fueron calentados en una mufla a una temperatura de 500 °C por 2 h. El cálculo del % de cenizas se realizó de acuerdo a la ecuación 7:

$$\% \text{ De cenizas} = \frac{(P-p) \times 100}{M} \text{ Ecuación 7}$$

Donde:

P = Peso del crisol con la muestra calcinada (g)

p = Peso del crisol vacío (g), M = masa de la muestra (g)

7.3.4. Metodología de superficie de respuesta para la extracción de polifenoles

Una vez caracterizadas, las harinas de limón persa fueron empleadas para realizar la extracción de los compuestos polifenólicos, empleando un sistema de ultrasonido modelo GEX130PB, fijo a una potencia de 130 W y a una frecuencia de 20 kHz, acoplado a una sonda de 13 mm de diámetro (S/N: 79799W-04-14).

En el presente estudio se realizó un análisis del efecto de las principales variables involucradas en el proceso de EAU mediante la implementación de la MSR, una herramienta matemática y estadística que ha sido ampliamente utilizada para optimizar las condiciones experimentales de un proceso (Chen et al. 2015). Por lo tanto, se aplicó un diseño experimental por Box-Behnken evaluando 4 factores en tres niveles diferentes (tabla 5). Los cuatros factores elegidos fueron codificados como X_1 : concentración de etanol (50-70%), X_2 tiempo de sonicación (10-15 min), X_3 : amplitud de radiación (60-90%) y X_4 : relación soluto-solvente (40-50 mL/g). Mientras que los niveles fueron codificados como -1 (bajo), 0 (punto central) y 1 (alto).

Tabla 5. Factores y niveles propuestos para la extracción de polifenoles asistida por ultrasonido mediante MSR por Box-Behnken

Nivel codificado	Factores			
	Concentración de etanol (%)	Tiempo (Min)	Amplitud de radiación (%)	Relación Solutosolvente (mL/g)
-1	50	10	60	40
0	60	12.5	80	45
+1	70	15	90	50

Resumen:

Número de factores experimentales: 4

Número de niveles: 3

Número de respuestas: 1 (expresados como mg EAG/g bs)

Número de corridas: 27

El número de experimentos (N) requeridos para el desarrollo del diseño fue definido a partir de la ecuación:

$$N = 2k(k-1) + C_0 \text{ Ecuación 8}$$

Donde K corresponde al número de factores y C₀ es el número de puntos centrales. Las condiciones de cada corrida se determinaron empleando un paquete estadístico (Statgraphics Centurion, versión XVI.I), el cual desarrolló un total de 27 corridas, descritas en la tabla 10.

Los resultados de la variable de respuesta (rendimiento de extracción) se ajustaron de acuerdo a una ecuación polinomial de segundo orden (modelo cuadrático) (ecuación 9).

$$Y = B_0 + \sum_{i=1}^k B_i X_i + \sum_{i=1}^k B_{ii} X_i^2 + \sum_{i>j}^k B_{ij} X_j + E \text{ Ecuación 9}$$

Donde Y representa la variable de respuesta (rendimiento de polifenoles totales); B₀ corresponde a un coeficiente constante; B_i, B_{ii} y B_{ij} son los coeficientes de regresión de los términos lineales, cuadráticos e interactivos, respectivamente, y X_i y X_j representan las variables independientes. Los coeficientes de regresión determinados a partir del análisis de varianza, se emplearon para generar gráficos de superficie a partir de la ecuación polinomial ajustada.

Para verificar la adecuación del modelo, se realizaron ensayos de extracción adicionales de acuerdo a condiciones óptimas predichas, comparando los datos experimentales con los valores predichos por el modelo de regresión (Nayak et al. 2015).

7.3.5. Cuantificación de polifenoles totales

7.3.5.1. Método espectrofotométrico

La cuantificación espectrofotométrica de los polifenoles se realizó mediante el método reportado por (Nayak et al. 2015) con ligeras modificaciones. Por lo cual, 250 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu (1N) fueron mezclados con 20 µL del extracto más 1250 µL de una solución de carbonato de sodio (Na₂CO₃) al 20 % y 480 µL de agua destilada, dejando reaccionar durante 30 min a temperatura ambiente para finalmente medir la absorbancia a λ= 760 nm. La concentración de polifenoles libres se expresó como mg equivalente de ácido gálico (EAG)/g base seca, a partir de la pendiente generada de una curva de ácido gálico cuyas concentraciones fueron: 50, 100, 200, 450 y 600 ppm (**Anexo 1**).

7.3.5.2. Análisis UPLC-PDA

Los perfiles cromatográficos se realizaron utilizando un cromatógrafo líquido de ultra resolución (UPLC por sus siglas en inglés) Waters Acquity H Class (Milford, MA, EE. UU) equipado con una bomba cuaternaria (UPQSM), un inyector automático (UPPDALTC) y un detector de matriz de fotodiodos PDA λ (UPPDALTC). El software Empower 3 (Waters, Milford, MA, EE.UU., 2010) fue empleado para la adquisición de datos y procesamiento. La separación cromatográfica de los compuestos fenólicos se llevó a cabo usando una columna Waters Acquity UPLC BEH C18, 1.7 μm , 100 x 2.1 mm I.D. (Milford, MA, EE.UU.) a temperatura ambiente, el caudal se mantuvo en 0.2 mL min^{-1} y el volumen de inyección se programó a 2 μL . La fase móvil consistió en la mezcla de dos disolventes: ácido fórmico 0.1% en agua ultrapura (A) y ácido fórmico al 0.1% en acetonitrilo (B). El gradiente se programó como se describe a continuación: 100% A (inicial 2.0 min), 90.0% A (2.0-4.0 min), 77.0% A (4.0-6.0 min), 77.0% A (6.0-7.0 min), 76.5% A (7.0 – 17.5 min), 0% A (17.5 – 18.0 min), 50 % A (18.0 – 24.0 min) y 100% A (24.0 - 30 min). El detector de fotodiodos se fijó a 290 nm con una resolución de 4.8 nm para la detección del analito.

7.3.6. Evaluación de la capacidad antioxidante de los polifenoles

7.3.6.1. Evaluación por el método de DPPH•

La actividad antioxidante fue evaluada en función de la capacidad de reducción del radical DPPH•, siguiendo la metodología reportada por Vazquez-Flota et al. (2007). 2.9 mL de una solución de DPPH• 0.1 mM se mezclaron con 100 μL de las disoluciones del extracto, dejando reposar por un periodo de 30 min para posteriormente realizar la lectura espectrofotométrica, a $\lambda=515$ nm. El porcentaje de inhibición se calculó de acuerdo a la ecuación 10:

$$\text{Porcentaje de inhibición (\%)} = \frac{[Aa-(Ab-Ac)]}{Aa} \times 100 \quad \text{Ecuación 10}$$

Dónde:

Aa: Absorbancia del blanco de la solución de DPPH•

Ab: Absorbancia de la mezcla que contiene DPPH• y la muestra

Ac: Absorbancia de la solución en blanco

El % de inhibición del DPPH• se expresó como mg equivalente de Trolox/g bs, a partir de la pendiente generada de una curva de Trolox cuyas concentraciones fueron: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mM (**Anexo 2**).

7.3.6.2. Evaluación por el método de ABTS•

La actividad antioxidante se evaluó también en función de la capacidad de reducción del radical ABTS•, siguiendo la metodología reportada por Inssen et al. (2002). La formación del radical ABTS• (2 mM) se preparó a partir de la disolución de una pastilla de 10 mg de ABTS en 40 µL de persulfato de potasio (K₂S₄O₈) 70 mM y 10 mL de solución salina de buffer fosfato (PBS), preparada a partir de la mezcla de 8.18 g de NaCl, 0.27 g de KH₂PO₄, 1.42 g de Na₂HPO₄ y 0.15 g de KCl disuelto en 1 L de A, ajustada a un pH de 7.4. Esta solución se dejó reposar en la oscuridad a temperatura ambiente durante 16 h antes de su uso.

Para el estudio de la actividad antioxidante fue necesario ajustar la solución del ABTS• a una absorbancia de 0.700 ± 0.02 ($\lambda=734$ nm), diluyendo la solución con PBS. Posteriormente se hizo reaccionar 990 µL de solución ajustada de ABTS• ($\lambda=734$ nm) con 10 µL del compuesto antioxidante, la absorbancia se leyó a temperatura ambiente después de incubar por 6 min. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. El porcentaje de disminución de la absorbancia del ABTS• se expresó como mil-equivalente Trolox a partir de la pendiente del gráfico de la curva de calibración. En donde se presenta la inhibición del ABTS• frente a soluciones de Trolox de concentraciones correspondientes a: 125, 250, 375, 625, 875 ppm (**anexo 2**).

7.3.7. Determinación de la actividad antibacteriana de los polifenoles

La actividad biológica se evaluó frente a los microorganismos: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, los cuales fueron adquiridos del cepario del CIATEJ, Unidad Sureste. Las cepas fueron reactivadas en caldo nutritivo y sembradas en placa para la evaluación de su viabilidad y pureza.

7.3.7.1. Concentración mínima inhibitoria

Para esta prueba se empleó la metodología propuesta por Dzul (2014) con ligeras modificaciones. La Concentración mínima inhibitoria (CMI) se realizó empleando micro-placas

de 96 pozos donde se realizaron microensayos de siete diluciones seriadas del extracto polifenólico, empleando solución salina al 0.85 % para realizar la dilución. Para ello se mezclaron 50 µL del extracto polifenólico con 100 µL del medio de cultivo Mueller-Hinton y 50 µL de inóculo de cada bacteria con una concentración final de 10⁶ UFC/mL. Las microplacas fueron incubadas a 37 °C por 24 h, después de este tiempo se adicionaron 30 µL de solución de cloruro de p-yodonitrotetrazolio (0.2 mg/mL) como indicador del crecimiento, utilizando solución salina como control negativo. Después de una hora de incubación se verificó la presencia de cambio de color rosado como indicador de crecimiento, el valor de la primera concentración de polifenoles en donde no se presentó cambio de coloración fue registrado como valor de CMI.

7.4. Etapa 2: Obtención de quitosano asistida por ultrasonido

7.4.1. Material biológico para obtención de quitosano

Los exoesqueletos de camarón blanco (*Litopenneaus vanamei*) fueron colectados de una granja acuícola ubicada en Sisal, Yucatán. Estos fueron transportados al CIATEJ, Unidad Sureste, en donde se lavaron y enjuagaron con agua corriente hasta remover la mayor cantidad posible de residuos contaminantes. Posteriormente se secaron en un horno de convección eléctrica Jersa (No. 148-09) a una temperatura de 50 °C ± 1°C por un periodo de 12 h, y a continuación fueron triturados con una licuadora (modelo Osterizer Galaxie). La harina obtenida se tamizó utilizando una malla de 0.0197 in (0.05 cm).

7.4.2. Extracción de quitina

La extracción de quitina se realizó por el método reportado por Robles et al. (2016), el cual consistió en dos etapas continuas: desmineralización y desproteínización.

7.4.2.1. Desmineralización

Los exoesqueletos tamizados fueron tratados con HCl 2M a temperatura ambiente, en una relación de 1:20 (p/v), la muestra se mantuvo en agitación constante por un periodo de 3 h. Posteriormente las fases acuosa y sólida se separaron por filtración al vacío utilizando un embudo Buchner y papel filtro Whatman No. 4.

7.4.2.2. Desproteínización

Los exoesqueletos previamente desmineralizados se trataron con una solución de NaOH 2M a una relación de 1:10 (p/v) y la mezcla se mantuvo en agitación durante 24 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se detuvo la agitación permitiendo que los sólidos precipitaran, para después realizar la neutralización con HCl 2M. La quitina fue recuperada mediante filtración al vacío con un embudo Buchner y papel filtro Whatman 4. El producto obtenido fue secado en horno por 12 h a 50°C y finalmente fue tamizada utilizando una malla de 0.0197 in (0.05 cm).

7.4.3. Desacetilación asistida por ultrasonido

Con el objetivo de determinar las mejores condiciones del proceso de desacetilación asistida por ultrasonido, se planteó un diseño factorial 2^3 , evaluando 3 factores en dos niveles diferentes. Los tres factores elegidos fueron la concentración de NaOH (50 y 65%), la amplitud de radiación (75 y 90%) y el intervalo de sonicación (5-5 y 7.5-5 min), generando un total de 8 corridas diferentes (tabla 6), las cuales se realizaron de acuerdo a la metodología descrita por Birolli et al. (2016). Los períodos de irradiación de ultrasonidos (5 min y 7.5 min) se alternaron con períodos de no irradiación (5 min) durante los cuales la suspensión se agitó constantemente. Las variables de respuesta fueron la solubilidad del quitosano en ácido acético al 1%.

Tabla 6. Factores y niveles propuestos para la desacetilación de quitina asistida por ultrasonido mediante un diseño factorial 2^3

Nivel codificado	Factores		
	NaOH (%)	Amplitud de radiación (%)	Intervalo de sonicación (Min)
-1	50	75	5-5
+1	65	90	7.5-5

Resumen:

Número de factores experimentales: 3

Número de niveles: 2

Número de respuestas: 1 (solubilidad del quitosano en ácido acético al 1%).

Número de corridas: 8

Para realizar la desacetilación se empleó un reactor con capacidad de 50 mL, a una relación de soluto/solvente (NaOH) de 45 mL/mg. El proceso se realizó empleando un sistema de

ultrasonido (modelo GEX130PB, 130 W, 20 kHz) acoplado a una sonda de 13 mm de diámetro, con intervalos de sonicación y de agitación magnética hasta alcanzar 90 min de reacción. Finalizada la reacción, se procedió a neutralizar la solución con HCl 17.5 % (p/v), para después recuperar la fase sólida mediante filtración al vacío. El producto obtenido fue secado en horno por 12 h a 50°C y resguardado para su posterior caracterización.

Como tratamiento control se realizó la obtención de quitosano mediante un método químico convencional. Para lo cual se empleó una solución de NaOH al 50% a una relación de (45 mg/mL) por 5 h a 90–100 °C (Benhabiles et al. 2012). Transcurrido el tiempo de reacción la mezcla fue neutralizada con HCl al 50% y el quitosano se recuperó por filtración al vacío, para finalmente secarlo en un horno a 50°C por 12 h.

7.4.4. Evaluación de la solubilidad del quitosano

Las pruebas de solubilidad se realizaron de acuerdo a la metodología propuesta por Benhabiles et al. (2012), utilizando ácido acético al 1%. Para ello 0.1 g de quitosano fue mezclado con 40 mL de ácido, dejando en agitación por 18 h. Posteriormente la solución se filtró al vacío en papel Whatman 4 (previamente secado a 100°C por 12h y pesado) y se secó en horno a 50°C por 12 h, transfiriendo el producto en un desecador, para finalmente cuantificar el porcentaje de solubilidad por diferencia de peso.

7.4.5. Caracterización fisicoquímica de quitosano

7.4.5.1. Determinación de proteína por el método Kjeldahl

La determinación de proteína se efectuó mediante un equipo automatizado VELP SCIENTIFICA, seleccionando el programa 7 del Velp Scientifica – Operating Manual UDK129 adecuado para la determinación del contenido proteico en carnes y harina de pescado.

7.4.5.2. Determinación del DA por RMN-H¹

El porcentaje de DA se determinó por espectroscopia de RMN-H¹ de acuerdo al método reportado por Hirai et al. (1991) calculando la relación de la intensidad (I) de las señales del protón del metil-(1-4)2 acetomido-2-dexoxy-β-D-glucano y la referencia de los protones H-2 al H-6 a través de la ecuación 1, descrita en la sección 3.10.1.

Los espectros de RMN- ^1H se obtuvieron a 80°C utilizando un espectrómetro Bruker AVANCE III ($\nu = 400\text{ MHz}$). 10 mg de quitosano se disolvieron en HCl al 1% en agua deuterada (D_2O), se mantuvo bajo agitación magnética constante durante una noche y luego se tomó una alícuota para realizar el análisis (Fiamingo et al. 2016).

7.4.5.3. Determinación del PM por cromatografía de exclusión de tamaño

La determinación del PM se realizó mediante la cuantificación por cromatografía de exclusión de tamaño (SEC). Para realizar el análisis el quitosano se disolvió la muestra en buffer de acetato de amonio (0.15 mol/L) y ácido acético (0.20 mol/L) a $\text{pH} = 4.5$, que también fue usado como eluyente a velocidad de flujo constante (0.5 mL/min). Las soluciones de quitosano ($C_p = 0.5\text{ g/L}$) se filtraron a través de una membrana de acetato de celulosa de $0.45\ \mu\text{m}$ (Millipore) y luego se inyectaron ($\nu = 100\ \mu\text{L}$) en columnas TSK2500 y TSK6000 (Tosoh Bioscience). De acuerdo con el grado medio de acetilación (DA) del quitosano, se utilizó el valor de incremento del índice de refracción (dn/dc) para determinar el peso molecular medio (PM) y la dispersidad (\mathfrak{D}) (Fiamingo et al. 2016).

7.4.5.4. Análisis de espectroscopia de Infrarrojo-Transformada de Fourier

Los espectros de las muestras fueron generados empleando un espectrómetro FT-IR (Agilent Cary 630) en modo de reflectancia total atenuada (ATR). El análisis se realizó en un intervalo de longitud de onda de $600\text{ a }4000\text{ cm}^{-1}$

7.4.5.5. Análisis de difracción de rayos-X

El análisis de difracción de rayos-X fue realizado mediante un difractómetro Bruker modelo D8 Advance, equipado con un detector Lynxeye, empleando una radiación incidente de $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1.5418\ \text{\AA}$), en el rango de $2\theta = 5^\circ$ (scan: $0-0.05^\circ$) a una velocidad de $1^\circ/\text{min}$. El voltaje operado fue de 40 kV a una corriente de 40 mA.

7.5. Etapa 3A: Formación de nanopartículas de quitosano por gelificación iónica

Con el objetivo de determinar las mejores condiciones de formación de Nps de quitosano se planteó un diseño factorial: 2^{5-1} , evaluando 5 factores en dos niveles diferentes. Los factores

elegidos fueron la concentración de quitosano (0.1-0.2%), la relación de quitosano/TPP (3/1-7/1), el pH del medio (4.5-5.5), el tiempo de agitación (1-2 h) y la implementación de sonicación (si-no), generando un total de 16 corridas diferentes (tabla 7), las cuales se realizaron de acuerdo a las metodología descrita por Lange et al. (2014) con algunas modificaciones. Las variables de respuesta del diseño fueron el tamaño, el potencial Z y el índice de polidispersión (IPD) de las Nps.

Tabla 7. Factores y niveles propuestos para la obtención de nanopartículas de quitosano mediante un diseño factorial 2^{5-1}

Nivel codificado	Factores				
	Quitosano (%)	Q-TPP (v/v)	pH	Tiempo (h)	Sonicación (5 min)
-1	0.1	3:1	4.5	1	Si
+1	0.2	7:1	5.5	2	No

Resumen:

Número de factores experimentales: 5

Número de niveles: 2

Número de respuestas: 3 (potencial Z, tamaño de partícula, IPD)

Número de corridas: 16

El proceso de gelificación iónica se realizó por mezcla de la solución de quitosano con una solución de TPP, cuya concentración, proporción y pH se ajustaron de acuerdo a las condiciones establecidas por el diseño. Estas suspensiones fueron agitadas a temperatura ambiente y finalmente, se centrifugaron a 12000 g durante 15 min para extraer el hidrogel nanoparticulado de la suspensión(Callaghan & Kerry 2016). Para los tratamientos en donde se planteó evaluar el efecto de sonicación, se empleó un sistema de ultrasonido (modelo GEX130PB, 130 W, 20 kHz) acoplado a una sonda de 13 mm de diámetro, a una amplitud de 70% por 5 min.

7.5.1. Tamaño medio de partícula e índice de polidispersión

Ambos parámetros se estimaron usando un Zsizer Nano ZS90 (Malvern Instrument, UK). El tamaño hidrodinámico (diámetro medio, dh) se calculó mediante la ecuación de Stokes-Einstein:

$$dh = kBT/3\pi\eta sD \text{ Ecuación 11}$$

donde k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura (K), η_s es la viscosidad del disolvente y D es el coeficiente de difusión translacional. Para realizar el análisis, fue necesario determinar previamente el índice de refracción de la solución. Todas las mediciones se realizaron en una celda a 25 °C.

El IPD fue indicativo de la distribución de las moléculas. Las distribuciones fueron consideradas como amplias cuando el $IPD \geq 0.5$, mientras que cuando el valor fue de $IPD \leq 0.3$, las soluciones fueron consideradas mono-dispersas.

7.5.2. Potencial Z de las partículas de quitosano

El potencial Z se determinó usando un equipo de dispersión de luz electroforética Z-sizer Nano ZS90, cuyo software convierte la medida de movilidad electroforética de la solución en valores de potencial Z usando el modelo de Smoluchowsky. Las mediciones se llevaron a cabo usando una celda de inmersión universal (ZEN1002, Malvern Instrument) a 25 °C.

7.6. Etapa 3B: Encapsulación de polifenoles

Una vez seleccionadas las mejores condiciones para la obtención de las Nps de quitosano, se procedió a realizar la encapsulación de los compuestos polifenólicos. La encapsulación se realizó a partir de la mezcla del extracto polifenólico con la solución de las Nps, a una relación 1:1 (Parize et al. 2012). Como control, se realizó además la encapsulación del extracto polifenólico empleando nanopartículas de quitosano comercial (Sigma, de bajo peso molecular, grado de desacetilación 83%).

Las mezclas correspondientes a los encapsulados, fueron agitadas por 1 hora a temperatura ambiente y posteriormente fueron sonicadas mediante un sistema de ultrasonido (modelo GEX130PB, 130 W, 20 kHz) acoplado a una sonda de 13 mm de diámetro, a una amplitud de 50% por 8 min. Finalmente, las soluciones se centrifugaron a 14000 g por 15 min a 25°C, para separar el sobrenadante del pellet. Ambas muestras fueron resguardadas a 4 °C para su posterior caracterización.

7.6.1. Eficiencia de encapsulación

El porcentaje de eficiencia de encapsulación (%E-Cap) de los compuestos polifenólicos se realizó de acuerdo a la ecuación 12:

$$\%E - \text{Cap: } \frac{\text{Concentración inicial} - \text{Concentración de los compuestos no encapsulados}}{\text{Concentración inicial}} \times 100 \text{ Ecuación 12}$$

En donde la concentración inicial corresponde a la concentración del extracto polifenólico empleado para formar los encapsulados; mientras que la concentración de los compuestos no encapsulados, corresponde al contenido de polifenoles en el sobrenadante. El análisis de los compuestos se realizó mediante la cuantificación por UPLC (Gopalakrishnan et al. 2014).

7.6.2. Eficiencia de liberación

El porcentaje de eficiencia de liberación (%E-Lib) de los encapsulados se evaluó en 3 medios diferentes: ácido acético 1% (pH: 2.80), buffer fosfato (pH: 7) y cloruro de calcio 1% (pH: 5.12). Para ello 5 mg de los encapsulados, los cuales fueron previamente secados, se dispersaron en 5 mL de cada solución. Posteriormente, las soluciones fueron sonicadas por 5 min a una amplitud de onda del 50%, para finalmente centrifugar la solución a 4000 rpm por 15 min. El análisis se realizó mediante la cuantificación por UPLC, de acuerdo a la ecuación 13:

$$\%E - \text{Lib: } \frac{\text{Concentración de los compuestos en el sobrenadante}}{\text{Concentración inicial}} \times 100 \text{ Ecuación 13}$$

7.7. Etapa 4: Caracterización fisicoquímica de los encapsulados

Con el objetivo de evidenciar las interacciones entre las Nps de quitosano con los compuestos polifenólicos se realizó en análisis por espectroscopia de IR-FT y difracción de rayos-X, las metodologías se realizaron de acuerdo a los apartados 7.4.5.4 y 7.4.5.5, respectivamente. Así mismo, se determinó el tamaño, el potencial Z e IPD de los encapsulados, de acuerdo a la metodología descrita en el apartado 7.5.2 y 7.5.3.

La estabilidad térmica se estudió mediante las técnicas de calorimetría diferencial de barrido (DSC por sus siglas en inglés) y análisis termogravimétrico (TGA por sus siglas en inglés) descritas en los siguientes apartados:

7.7.1. Calorimetría diferencial de barrido

El análisis se realizó utilizando un equipo de calorimetría diferencial de barrido (DSC), Q-2000 TA-Instruments (New Castle, DE, EE.UU.). Para ello de 5-10 mg de la muestra se secaron en recipientes no herméticos de aluminio en la cámara del DSC. El ciclo de calentamiento utilizado fue el siguiente: (1) rampa de calentamiento: 10 °C/min a 50°C, (2) rampa de calentamiento: 5

°C/min a 140°C, (3) equilibrar temperatura: 50°C, (4) rampa de calentamiento: 10 °C/min a 240°C

Se utilizó como referencia una charola no hermética de aluminio vacía. El instrumento se purgó con nitrógeno a una velocidad de flujo de 50 mL/min. Todas las mediciones se hicieron por triplicado. Los datos se analizaron utilizando el software Universal Analysis 2000, versión 4.7a (TA Instruments, New Castle, EUA). El valor de la temperatura de transición (T_g) se calculó utilizando el punto de inflexión de la señal reversible de flujo de calor.

7.7. 2. Análisis termogravimétrico

El Análisis termogravimétrico (TGA) se realizó bajo una atmósfera de helio en un flujo de 60 mL/min, utilizando un equipo TGA Q500 (TA Instruments). Se pesaron de 10 mg de muestra, utilizando una charola hermética de aluminio. La velocidad de calentamiento programada fue 10 °C/min a hasta alcanzar los 500 °C

Los datos se analizaron utilizando el software Universal Analysis 2000, versión 4.7a (TA Instruments, New Castle, EUA).

7.7. 3. Evaluación de la actividad antioxidante y antibacteriana de los encapsulados

Se evaluó la actividad antioxidante de los encapsulados mediante el ensayo del radical DPPH• y del radical ABTS•, de acuerdo a las metodologías descritas en la sección 7.3.6.

Para la evaluación de la actividad antibacteriana se realizó la determinación de la CMI, descrita en el apartado 7.3.7.

8. RESULTADOS Y DISCUSIONES

En los siguientes apartados se presentan los resultados obtenidos, los cuales, se encuentran divididos en cuatro etapas diferentes, de acuerdo a la estrategia experimental planteada: 1) extracción de polifenoles, 2) obtención de quitosano, 3) encapsulación y 4) caracterización de los compuestos encapsulados.

8.1. Etapa 1: Extracción de polifenoles asistida por ultrasonido

A continuación, se presenta en la figura 16, el diagrama de flujo que describe el proceso realizado para la obtención de un extracto polifenólico obtenido a partir de residuos de limón persa (*Citrus latifolia*), en donde se reporta el rendimiento del proceso entre cada etapa.

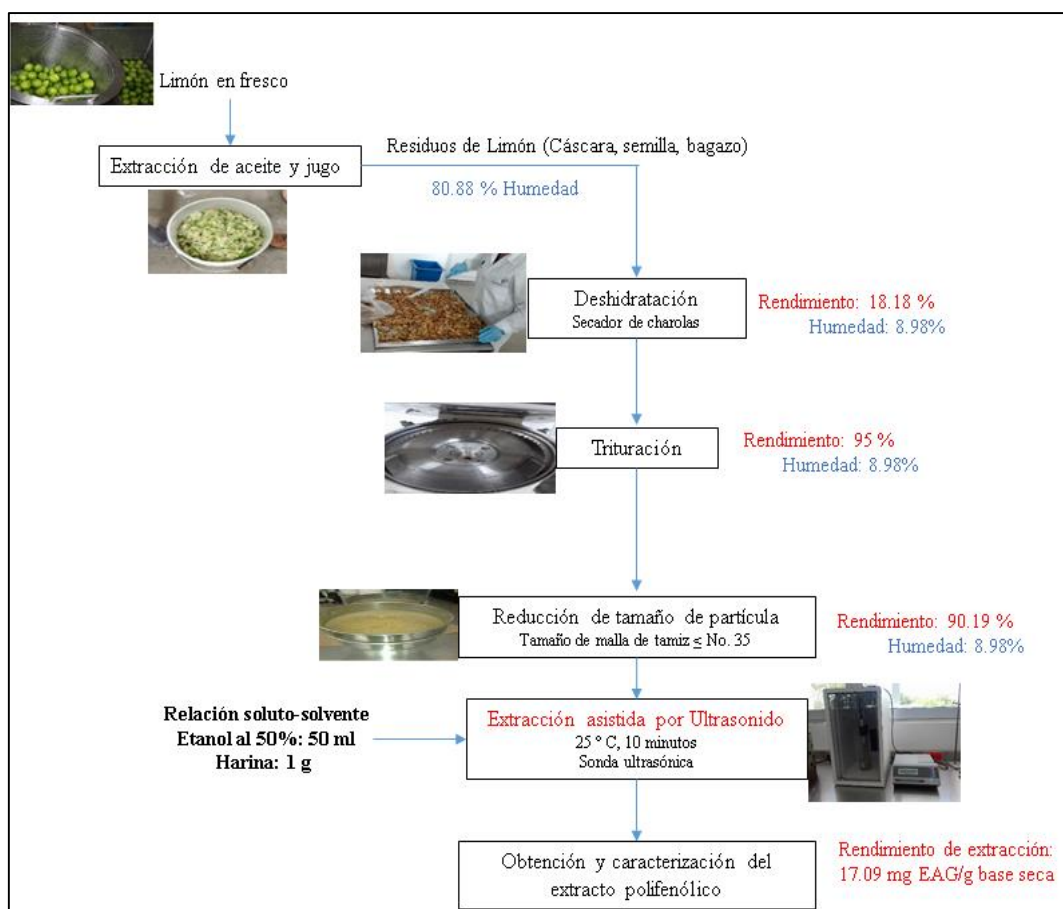


Figura 16. Diagrama de flujo del proceso de obtención de polifenoles procedentes de residuos de limón persa (*Citrus latifolia*) de acuerdo a las condiciones óptimas de EAU.

En los apartados posteriores (8.1.1 – 8.1.5), se discutirán los resultados obtenidos para la realización de la etapa 1.

8.1.1. Obtención y caracterización de harina de limón persa

El secado es un método de conservación que además de reducir la cantidad de agua, permite reducir el volumen de un producto, facilitando en algunos casos la extracción de compuestos de interés (Drosou et al. 2015). Por tal motivo, los residuos de limón persa (*Citrus latifolia*) fueron sometidos a un proceso previo de deshidratación. La harina resultante fue caracterizada, en función a los parámetros descritos en la tabla 8.

Tabla 8. Resultados de la caracterización fisicoquímica de la harina de limón persa (*Citrus latifolia*).

	Parámetro	Determinación
	Actividad de agua	0.340 ± 0.007
	% humedad	8.98 ± 0.35
	pH	2.89 ± 0.01
	Acidez titulable (expresada como ácido cítrico)	6.68 ± 0.027
	° Brix	9.0 ± 0
	Índice de madurez (°Brix/Ac)	1.347 ± 0.05
	% Cenizas	7.119 ± 1.523
	Luminosidad (L*)	80.32 ± 2.43
	Coordenadas rojo/verde (a*)	1.73 ± 0.65
Color	Coordenadas amarillo/azul (b*)	35.12 ± 1.25
	Índice de color	0.45 ± 0.17
	° Hue	35.16 ± 1.26

Los datos son valores promedio ± SD (n=3).

El objetivo principal de la reducción parcial del agua libre (a_w) es evitar o reducir el crecimiento microbiano. El valor de a_w obtenido para la harina de limón persa fue igual a 0.340, considerando a este valor como de bajo riesgo para el crecimiento microbiano (Beckers et al. 2013). Por su parte, el porcentaje de humedad de la muestra (8.98%) se encontró dentro de los valores permitidos por el CODEX STAN 152-1985 para la elaboración de harinas (15%).

Los valores de pH (2.89) y acidez titulable (6.68) observados pueden deberse a la presencia de ácidos orgánicos como el cítrico, málico y succínico reportados previamente en frutos de limón (Porras et al. 2004). Mientras que el valor de grados Brix (9.0°) puede asociarse a la contribución

de azúcares reductores (glucosa, fructosa, galactosa) y no reductores (sacarosa y trealosa). Por su parte, los resultados de color indicaron que la harina presentó altos valores de luminosidad (80), ligeramente superiores a los reportados para la harina de limón italiano (71.1) (Dzul 2014). Las coordenadas de color a^* (1.73) y b^* (35.12) indicaron que la harina presentó una tendencia hacia el color rojo/amarillo. Este valor se correlacionó con el valor del $^{\circ}$ Hue (35.16), encontrándose en el intervalo de 0° (rojo) a 90° (amarillo) (Dzul 2014). Los valores de L^* , a^* y b^* de los residuos en estado previo al secado no fueron determinados, sin embargo, estos presentaban una coloración verde, cuyo cambio en la coloración puede ser atribuida a la posible oxidación de pigmentos reportados en cáscaras de frutos cítricos como la cantaxantina, astaxantina, zeaxantina, luteína y β -criptoxantina; así como a la oxidación de azúcares reductores que pueden experimentar reacciones de Maillard durante el secado (Yoo & Moon 2016; Agócs et al. 2007).

8.1.2. Metodología de superficie de respuesta para obtención de polifenoles

En el presente estudio se realizó un análisis del efecto de cuatro factores en tres niveles durante la EAU de polifenoles, mediante la aplicación de la MSR de acuerdo un diseño experimental por Box-Behnken (DBB). Los factores elegidos fueron codificados como X_1 : concentración de etanol, X_2 : amplitud de radiación, X_3 : tiempo de sonicación y X_4 : relación soluto-solvente, siendo el rendimiento de extracción de polifenoles la respuesta de interés. En la tabla 9 se presentan los resultados obtenidos tras la ejecución de 27 corridas experimentales, cuyos resultados señalaron que la corrida 11 presentó la menor eficiencia de extracción, al contrario de la corrida 26, que presentó mayor rendimiento de extracción. Posteriormente, un modelo cuadrático fue ajustado a los resultados experimentales para evaluar la significancia y adecuación del modelo.

El Análisis de varianza de los resultados experimentales (tabla 10) demostró la significancia estadística ($p < 0.05$) para los 4 factores evaluados (X_1 , X_2 , X_3 y X_4). Con respecto al análisis de los efectos por interacción, los factores que causaron significancia fueron: X_1X_3 , X_1X_4 y X_2X_3 . Por otro lado, los factores X_2 y X_3 presentaron efecto de curvatura (cuadrático). De acuerdo al resultado del estadístico de R^2 se tiene que el modelo explicó en un 84.641% la variabilidad en el rendimiento de extracción. El error estándar del estimado demostró que la desviación estándar de los residuos fue de 0.9082.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Tabla 9. Contenido de polifenoles totales del extracto de limón persa bajo diferentes condiciones de extracción asistida por ultrasonido basado en un Diseño Box-Behnken para el análisis de superficie de respuesta.

Corrida	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Polifenoles totales	
	Concentración (etanol %)	Tiempo de sonicación (min)	Amplitud de radiación (%)	Relación Soluta/Solvente (g/mL)	Valor experimental (mg EAG/g b. s)	Valor predicho (mg EAG/g b. s)
1	70	12.5	80	40	12.35 ± 0.23	13.36
2	60	15	60	45	11.00 ± 0.43	11.86
3	60	15	100	45	11.27 ± 0.29	10.55
4	60	12.5	60	40	11.41 ± 0.20	9.81
5	70	12.5	60	45	10.43 ± 0.14	10.04
6	60	12.5	100	40	12.66 ± 0.51	12.17
7	60	12.5	100	50	13.62 ± 0.38	14.79
8	60	10	80	40	12.05 ± 0.23	12.74
9	50	12.5	100	45	12.34 ± 0.01	13.18
10	70	12.5	80	50	14.36 ± 0.58	14.52
11	60	10	60	45	8.10±0.01	9.01
12	60	15	80	40	12.17 ± 0.33	11.92
13	50	10	80	45	14.55 ± 0.43	14.44
14	60	12.5	60	50	12.73 ± 0.48	12.43
15	70	12.5	100	45	13.87 ± 0.01	13.78
16	60	12.5	80	45	13.31 ± 0.32	14.33
17	70	10	80	45	14.48 ± 0.29	13.66
18	60	12.5	80	45	14.86 ± 1.39	14.33
19	60	10	100	45	15.70 ± 0.02	15.03
20	60	10	80	50	15.34 ± 0.29	15.36
21	70	15	80	45	12.30 ± 0.17	12.84
22	60	12.5	80	45	14.34 ± 0.08	14.33
23	50	15	80	45	13.21 ± 0.40	13.63
24	60	15	80	50	15.36 ± 0.06	14.54
25	50	12.5	60	45	11.66 ± 0.20	12.21
26	50	12.5	80	50	17.83 ± 0.01	16.77
27	50	12.5	80	40	12.89 ± 0.59	12.68

Los datos son valores promedio ± SD (n=3).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Tabla 10. Análisis de varianza (ANOVA) para la optimización de extracción polifenoles de limón persa

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
X ₁ :Concentración de Etanol	3.70049	1	3.70049	4.49	0.0408
X ₂ :Tiempo de sonicación	4.03194	1	4.03194	4.89	0.0331
X ₃ :Amplitud de radiación	33.255	1	33.255	40.31	0.0000
X ₄ :Relación soluto-solvente	41.2545	1	41.2545	50.01	0.0000
X ₁ ²	0.0152847	1	0.0152847	0.02	0.8924
X ₁ X ₂	0.356168	1	0.356168	0.43	0.5151
X ₁ X ₃	3.8088	1	3.8088	4.62	0.0381
X ₁ X ₄	4.28074	1	4.28074	5.19	0.0284
X ₂ ²	4.23248	1	4.23248	5.13	0.0293
X ₂ X ₃	26.8974	1	26.8974	32.61	0.0000
X ₂ X ₄	0.0039605	1	0.0039605	0.00	0.9451
X ₃ ²	41.4611	1	41.4611	50.26	0.0000
X ₃ X ₄	0.061952	1	0.061952	0.08	0.7855
X ₄ ²	0.796554	1	0.796554	0.97	0.3320
Bloques	0.266002	1	0.266002	0.32	0.5735
Error total	31.3467	38	0.824913		
Total (corr.)	204.093	53			

R² = 84.64 %

Error estándar del est. = 0.9082

El efecto significativo de los factores evaluados puede ser observado en el diagrama de Pareto estandarizado correspondiente a la figura 17.

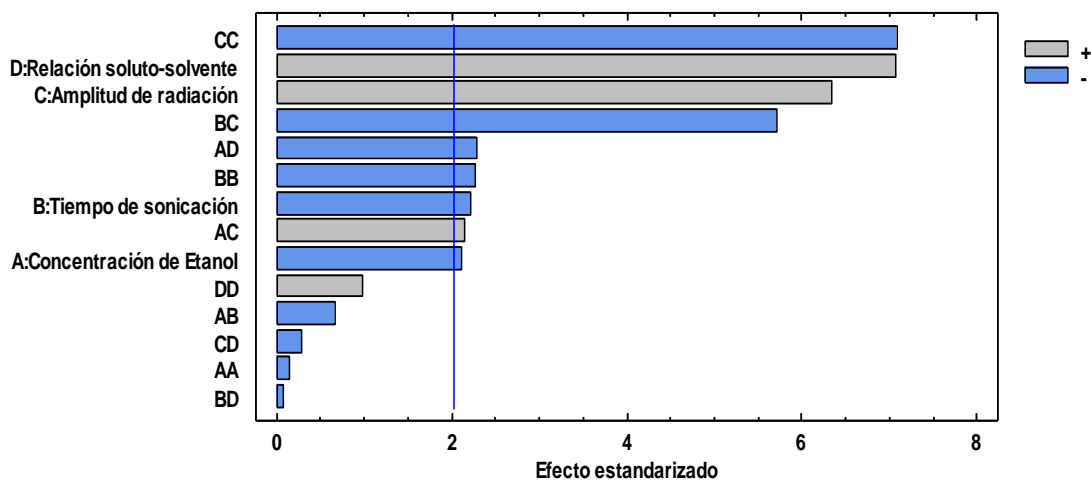


Figura 17. Gráfico de Pareto estandarizado para la extracción de polifenoles de limón persa.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Tabla 11. Coeficientes de regresión estimados para los factores evaluados en la extracción de polifenoles de limón persa

Coeficiente	Codificación	Estimado
Constante	B ₀	-107.09
Concentración de Etanol	X ₁	0.343
Tiempo de sonicación	X ₂	5.524
Amplitud de radiación	X ₃	1.122
Relación soluto-solvente	X ₄	1.140
Concentración de Etanol- Amplitud de radiación	X ₁ X ₃	0.003
Concentración de Etanol- Relación soluto-solvente	X ₁ X ₄	-0.014
Tiempo de sonicación- Tiempo de sonicación	X ₂ ²	-0.110
Tiempo de sonicación- Amplitud de radiación	X ₂ X ₃	-0.036
Amplitud de radiación- Amplitud de radiación	X ₃ ²	-0.005

A partir del análisis de varianza, se despreciaron los términos que no fueron significativos (X₁², X₁ X₂, X₂ X₄, X₃ X₄, X₄²) y posteriormente se determinaron los coeficientes de regresión para todos los efectos significativos (tabla 11). Estos coeficientes se emplearon para generar la ecuación de regresión ajustada (ecuación 14), cuya representación gráfica de la ecuación se observa en los gráficos de contorno de las figuras 18A y 18 B.

$$\text{Rendimiento de extracción (y)} = -107.09 + 0.343 X_1 + 5.524 X_2 + 1.122 X_3 + 1.140X_4 + 0.003X_1X_3 - 0.014X_1X_4 - 0.110X_2^2 - 0.036X_2X_3 - 0.005 X_3^2 \quad \text{Ecuación 14}$$

El valor máximo predicho para el contenido de polifenoles totales fue determinado usando el paquete estadístico Statgraphics Centurion, versión XVI.I, de acuerdo con el análisis del gráfico de superficie de respuesta. Las condiciones óptimas determinadas fueron: concentración de etanol del 50%, un tiempo de sonicación de 10 min, amplitud de radiación del 90.59% y relación soluto-solvente de 1/50 g/mL, cuyo valor máximo estimado fue igual 17.14 mg EAG/g bs. Estos resultados obtenidos fueron ligeramente superiores a los reportados por Dahmoune et al. (2013), quienes realizaron la optimización del proceso de EAU para la recuperación de polifenoles de limón procedentes de la región de Bejaia, Algeria, reportando un contenido total de 15.08 mg EAG/ g bs.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

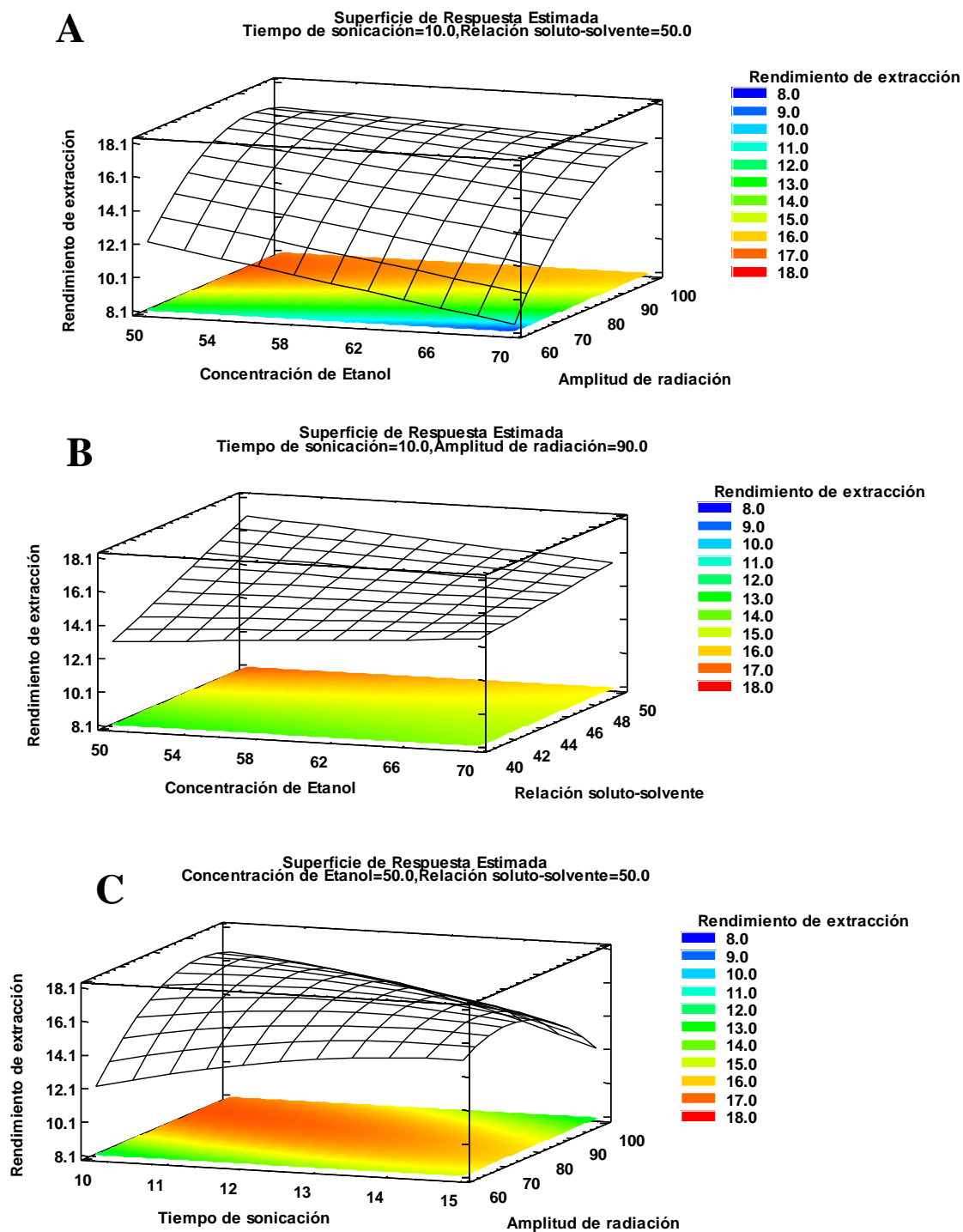


Figura 18. Gráficos de superficie de respuesta que muestran el efecto de los factores evaluados sobre el contenido polifenoles totales (PT). (A) PT frente a concentración de etanol y amplitud de radiación; (B) PT frente a concentración de etanol y relación soluto-solvente; (C) PT frente al tiempo de sonicación y amplitud de radiación.

8.1.3. Análisis de los efectos evaluados durante la EAU

Durante la EAU existen variables que están directamente relacionados con la eficiencia de extracción, tales como la manera en que el que se aplica a la irradiación de ultrasonido (directa o indirectamente) y las condiciones de extracción: tiempo, temperatura, tipo de disolvente y concentración utilizados. A continuación, se presenta un análisis de la influencia observada para cada variable sobre el rendimiento de EAU de los polifenoles de limón persa.

8.1.3.1. Efecto de porcentaje de amplitud

De acuerdo al gráfico de superficie de la figura 18, se observa que el rendimiento de extracción incrementó en función al incremento de amplitud, lo que podría explicarse por el aumento del número de compresiones y rarefacciones durante el periodo de extracción (Al-dhabi et al. 2017). Esta tendencia ha sido previamente reportada por Carrera et al. (2012), quienes reportaron diferencias estadísticas significativas al comparar los rendimientos de antocianinas usando amplitudes de onda de 20% y 50%; sugiriendo que una mayor amplitud ultrasónica induce un mayor número de cavidades, mejorando el proceso de extracción. Lo anterior demuestra que, en los sistemas de extracción de ultrasonido acoplados a una sonda, la amplitud juega un papel importante en la intensificación de la extracción.

8.1.3.2. Efecto de relación soluto-solvente

Los resultados obtenidos reportan un aumento en la concentración de polifenoles a medida que aumenta la relación soluto/disolvente. La relación reportada en el estudio fue similar a la reportada por Sousa et al. (2016), quienes indicaron que una proporción de 1-40 g/mL fue ideal para entrar en las células del soluto, mejorando la permeación de los polifenoles. Esto demuestra que la relación soluto/disolvente es uno de los factores más críticos durante la transferencia de masa, puesto que un mayor volumen de disolvente ayuda a acelerar el proceso de difusión (Muñiz-Márquez et al. 2013).

8.1.3.3. Efecto de tiempo de extracción

Los resultados del estudio indicaron que la extracción óptima se llevó a cabo a los 10.20 min de sonicación. Durante la EAU los solutos están en contacto con el disolvente, por lo que la eficiencia de extracción está fuertemente influenciada por el tiempo de interacción entre las dos fases (Hossain et al. 2012). De acuerdo a Selin Sahin (2013) el proceso de extracción puede alcanzar hasta un 90% de recuperación en los primeros 10-20 min, denominando a este periodo como etapa de "lavado", en donde se lleva a cabo la disolución de los componentes solubles sobre las superficies de la matriz (Tao et al. 2014). Si bien, estos mismos autores mencionan que existe una segunda etapa conocida como extracción lenta (hasta 60 min), debe considerarse que durante el proceso se busca minimizar el tiempo de extracción, y con esto el coste energético del proceso, por lo cual no se evaluaron tiempos superiores a los 15 min.

8.1.3.4. Efecto de concentración del solvente

Los resultados obtenidos reportaron que la concentración óptima de etanol fue igual al 50%. Esta concentración se encontró dentro de los valores reportados por Ledesma-Escobar et al. (2014) para la recuperación de polifenoles de limón extraídos por ultrasonido. En el presente estudio se planteó el uso de mezclas hidroalcohólicas de etanol, debido a que diversos autores coinciden en que se trata de uno de los sistemas más adecuados para la extracción, gracias a las diferentes polaridades de los polifenoles y la aceptabilidad de este sistema para el consumo humano al tener la denominación de "GRAS" (Generalmente Reconocido como Seguro) (Muñiz-márquez et al. 2013; Rodríguez-rojo et al. 2012; Rodrigues et al. 2015) .

8.1.3.5. Efecto de la naturaleza del solvente: análisis cromatográfico

Con el objetivo de evaluar el efecto de la concentración del solvente sobre el perfil cromatográfico del extracto, se procedió a realizar el análisis por cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC). En el análisis se evaluaron 3 extractos diferentes: el extracto obtenido mediante las condiciones óptimas de extracción (TU) (etanol 50%), un extracto obtenido con agua como solvente (UA) (etanol 0%) y un extracto empleando etanol (UE) (96%).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Los resultados de la cuantificación de polifenoles totales por UPLC se presentan en la figura 19, en donde se observó que la concentración de etanol presentó efectos significativos ($p < 0.05$), siendo el extracto UE el de mayor eficiencia de extracción, seguido de los extractos TU y UA.

La mayor eficiencia de extracción del etanol al 96% puede ser atribuida a la menor polaridad del mismo en comparación con el agua, favoreciendo la solubilidad y difusión de los polifenoles, al reducir la constante dieléctrica del disolvente (Garcia-Castello et al. 2015). Por otro lado, la menor eficiencia de extracción observada para el tratamiento acuoso puede deberse al posible incremento en la producción de radicales, producto de la disociación del agua bajo el efecto del ultrasonido, llevando a reacciones de oxidación de los compuestos (Rostagno et al. 2003).

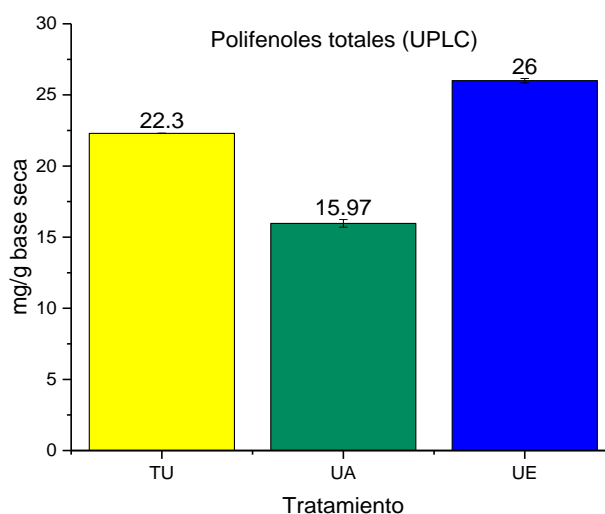


Figura 19. Cuantificación de polifenoles totales por UPLC. Los datos son valores promedio \pm SD ($n=3$).

El uso mezclas hidroalcohólicas ha sido propuesta por diversos autores (Galvan D'Alessandro et al. 2012; Drosou et al. 2015; Vilku et al. 2008), debido a que la mezcla de etanol-agua permite un efecto sinérgico entre los disolventes. El agua actúa como un agente de hinchamiento de la matriz vegetal, aumentando la superficie de contacto, mientras que el etanol induce la ruptura del enlace entre los solutos y la matriz (Corbin et al. 2015). Si bien, el extracto optimizado presentó un menor rendimiento de extracción con respecto al tratamiento UE, la diferencia observada no fue tan considerable (3.7 mg/g bs). Además de que una extracción empleando etanol al 96% implica un aumento en el costo de las operaciones posteriores, como

la concentración de los extractos obtenidos, así como un aumento en la cantidad de residuos generados (Dutra et al. 2016)

En la figura 20 se presenta el análisis del porcentaje de contribución de los principales compuestos polifenólicos extraídos en cada tratamiento, en donde puede observarse que los compuestos mayoritarios fueron la hesperidina y eriocitrina. Estos resultados concuerdan con los estudios realizados por Barreca et al. (2011), quienes reportan a estos dos flavonoides como los compuestos mayoritarios encontrados en extractos de limón.

Las diferencias observadas entre los tratamientos pueden asociarse con las diferentes polaridades de los compuestos polifenólicos extraídos, la cual determina la afinidad por el solvente empleado (Biesaga 2011). De manera general se observó que los compuestos más polares fueron mejor extraídos en agua, contrario a lo observado en los compuestos menos polares como la hesperidina, que presentó mayor recuperación en el tratamiento con etanol al 96%.

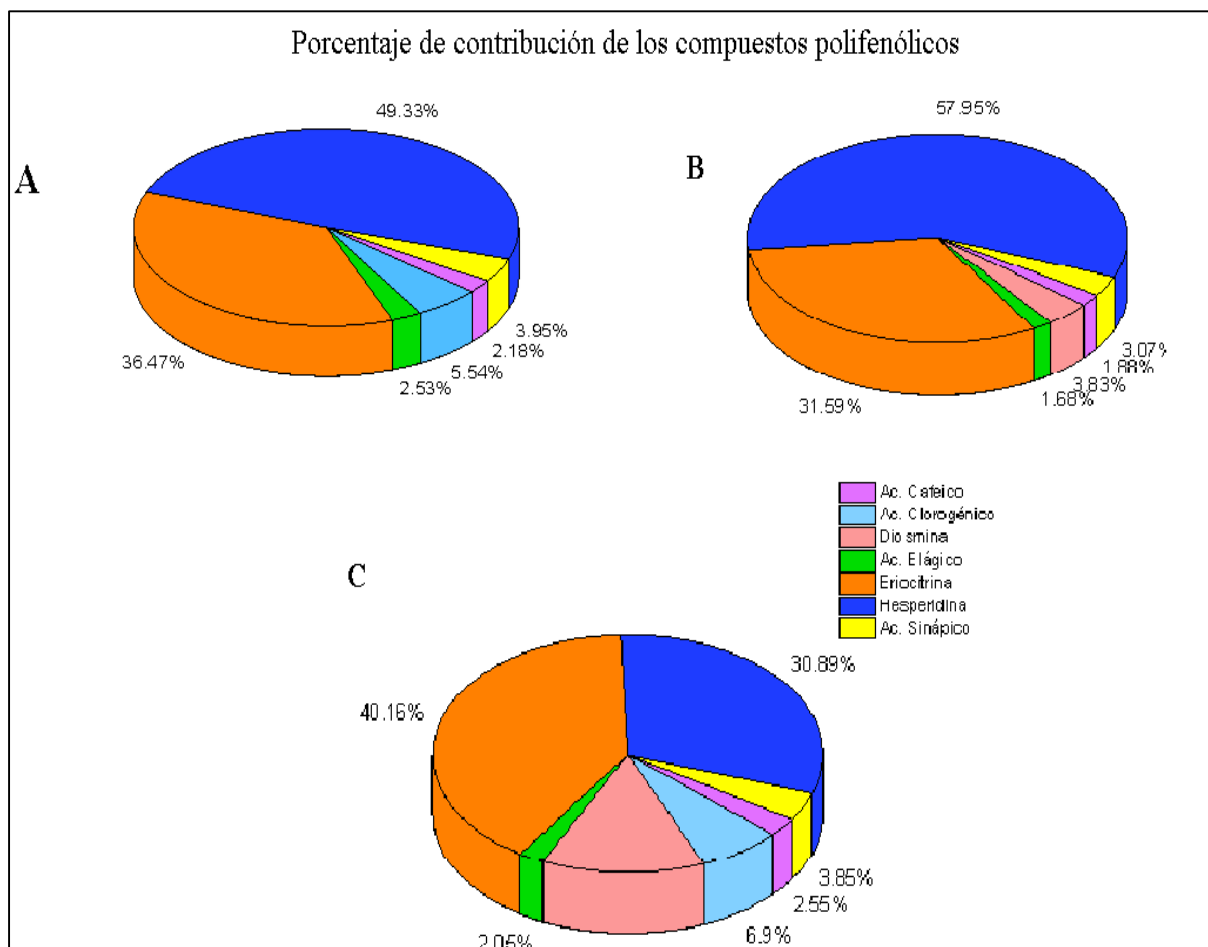


Figura 20. Porcentaje de contribución de cada uno de los compuestos polifenólicos identificados en los extractos evaluados. A) TU: extracción óptima (etanol 50) B) UE: extracción con etanol 96%, C) UA: extracción con agua.

El análisis del perfil cromatográfico de los diferentes extractos (figura 21) presentó la misma tendencia en el orden de elución de los compuestos polifenólicos (tiempo de retención: ácido clorogénico < ácido cafeico < eriocitrina < ácido elágico < ácido sinápico < diosmina < hesperidina). La secuencia de elución observada puede estar ligada a las características estructurales de los compuestos polifenólicos, puesto que los compuestos menos polares presentaron un mayor tiempo de retención para la columna C-18 (Brito et al. 2014). De acuerdo a Biesaga (2011) en los compuestos flavonoides la hidroxilación en el anillo B disminuye el tiempo de retención debido al aumento de la polaridad; mientras que la metilación en el anillo A, provoca un aumento del tiempo de retención, lo que podría explicar el mayor tiempo de retención observado en la hesperidina (Biesaga 2011).

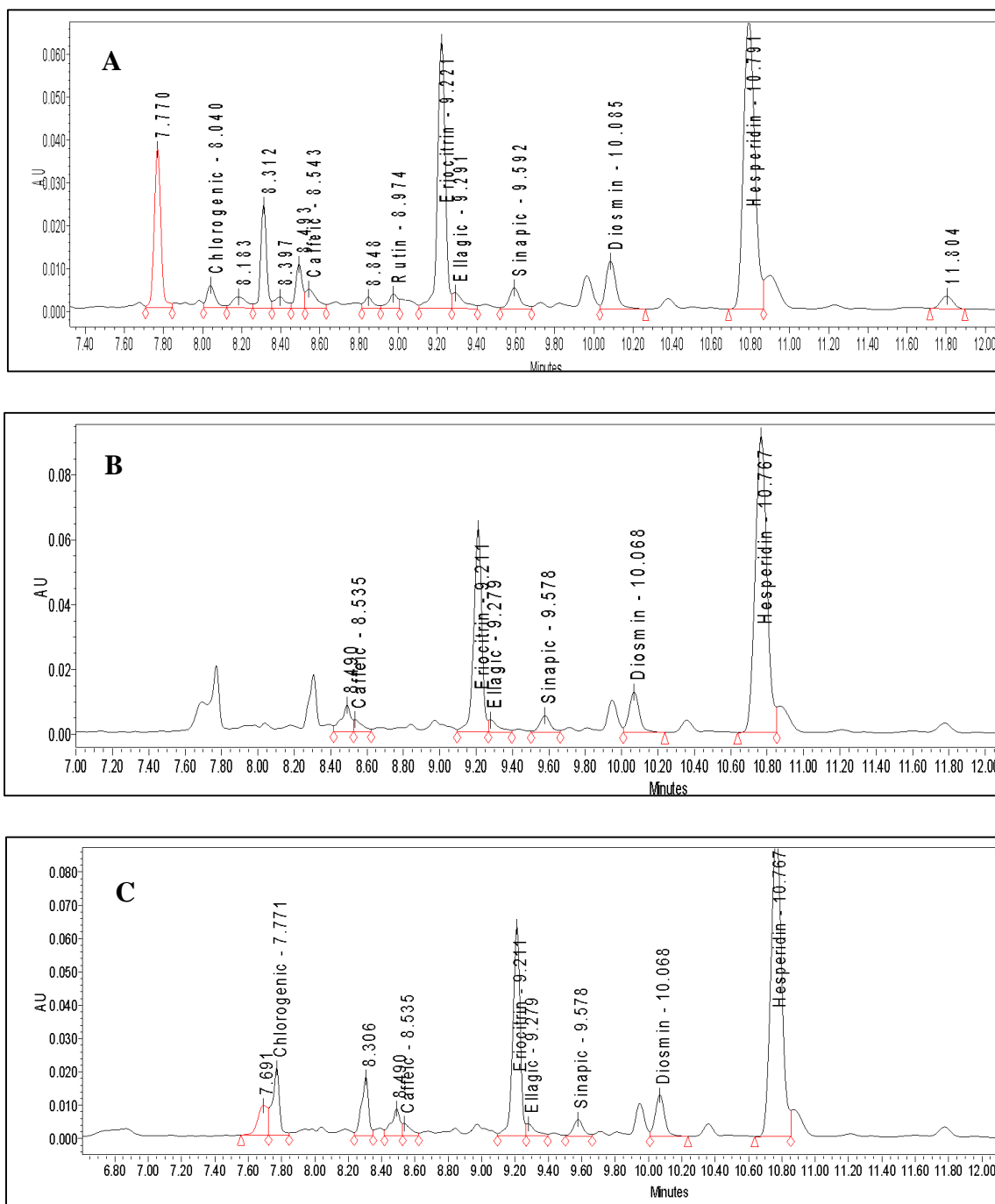


Figura 21. Cromatogramas obtenidos por UPLC para la evaluación del efecto de la concentración del solvente.

A) TU: Extracción óptima (etanol 50) B) UE: Extracción con etanol 96%, C) UA: Extracción con agua.

8.1.4. Efecto del método de extracción y el pre-tratamiento de la muestra

A fin de evaluar el efecto del pre-tratamiento de la materia prima, se procedió a realizar una comparación entre la eficiencia de extracción a partir del limón en fresco (FE) frente a la

eficiencia de extracción usando la muestra deshidratada (TU). De igual manera, se realizó un estudio comparativo frente al método de extracción por maceración (TM). Las condiciones empleadas para la extracción por maceración fueron etanol al 50%, por 60 min a una relación 1/50 de soluto solvente.

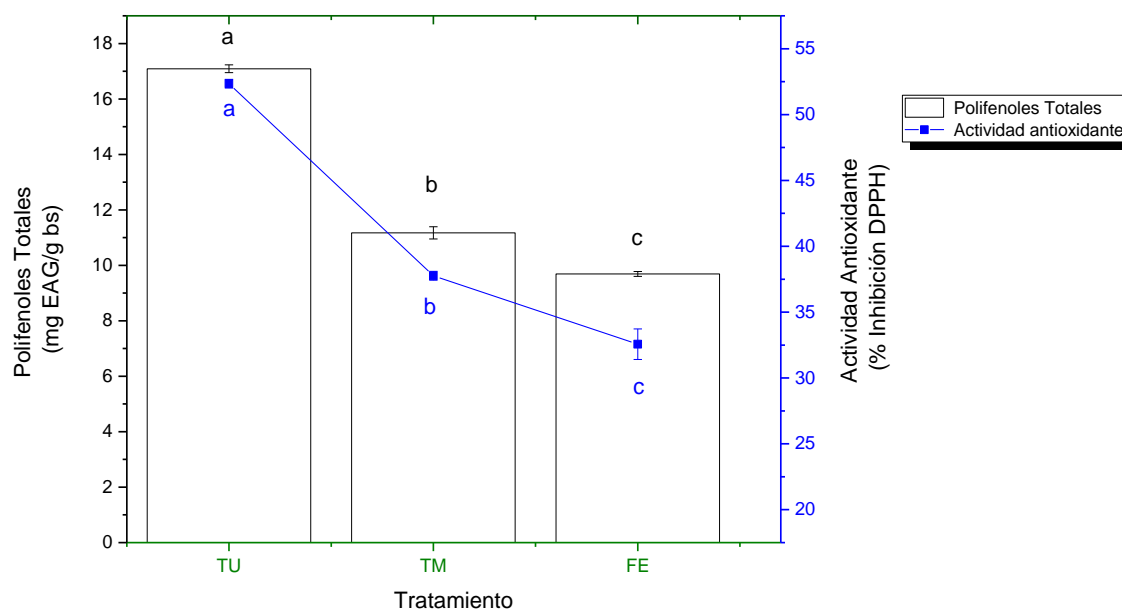


Figura 22. Correlación de polifenoles totales vs actividad antioxidante. Gráfico de barras: contenido de polifenoles totales (mg EAG/g bs). Grafica lineal: actividad antioxidante determinada mediante el ensayo de DPPH (% de inhibición del radical). Los datos son valores promedio \pm SD (n=3).

El grafico del contenido de polifenoles totales y de actividad antioxidante (figura 22), indicó que el pretratamiento de la materia prima y el método de extracción presentaron efectos significativos en ambas respuestas, siendo el tratamiento TU el que presentó mejores resultados. Así mismo pudo observarse una correlación entre ambas variables evaluadas.

La mejora en la eficiencia de extracción observada para el tratamiento deshidratado (TU) frente al tratamiento en fresco puede deberse a la capacidad del sustrato para hincharse e hidratarse, causando un aumento en los poros de la pared celular (Vilkhu et al. 2008). Adicionalmente, el proceso de reducción de tamaño de partícula (tamizado) pudo favorecer una mayor área de contacto entre el disolvente y las partículas favoreciendo la extracción de compuestos fenólicos (Mane et al. 2015).

Los resultados de la comparación de la EAU frente al método convencional presentaron tendencias similares a los reportadas por Garcia-Castello et al. (2015), quienes reportaron una mejora de hasta 1.7 veces al comparar la EAU frente a la maceración, para la recuperación de flavonoides a partir de los residuos de pomelo. Los resultados observados pueden deberse a la serie de mecanismos involucrados durante la EAU, como la fragmentación, atribuida a las colisiones entre partículas con las ondas ultrasónicas, y a la erosión, que ayuda a mejorar la accesibilidad del disolvente mediante la implosión de las burbujas sobre la superficie de la matriz vegetal. Entre otros mecanismos se encuentran la sonocapilaridad, sonoporación, y esfuerzo de cizallamiento, capaces de mejorar la penetración de líquido a través de los canales y alterar la permeabilidad de las membranas celulares, respectivamente (Chemat et al. 2017).

El aumento de la actividad antioxidante para el tratamiento TU confirma la correlación entre la actividad antioxidante y el contenido de polifenoles totales, reportada previamente por Khan et al. (2010) para la recuperación de polifenoles de cáscaras de naranja (*Citrus sinensis L.*).

8.1.5. Actividad antimicrobiana del extracto polifenólico

Los resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos polifenólicos (TU, TM y FE) se presentan en la tabla 12.

Tabla 12. Resultados de CMI para los extracto polifenólicos: TU, TM y FE. Determinados por el método de dilución en placa de 96 pozos.

Tratamiento	Microrganismo		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
TU (mg/gbs)	3.42 ± 0	3.42 ± 0	3.42 ± 0
TM (mg/gbs)	8.94 ± 0	6.70 ± 0	8.94 ± 0
FE (mg/gbs)	ND	7.75 ± 0	5.81 ± 0

N.D: No detectable. Los datos son valores promedio (n=2).

Estos resultados revelan que el extracto TU es el que presentó mejor actividad frente las cepas bacterianas, al inhibir a una menor concentración de polifenoles. Los resultados obtenidos coinciden con los reportados por Otang & Afolayan(2016) y Casquete et al. (2015) quienes

evaluaron el efecto antibacteriano de extractos de polifenoles procedentes de *Citrus limon L*, frente *S. aureus* y *E. coli*.

8.2. Etapa 2: Obtención de quitosano asistida por ultrasonido

En el siguiente diagrama de flujo (figura 23) se describe el proceso realizado para la obtención de quitosano obtenido a partir de residuos de camarón blanco (*Litopenneaus vanamei*), en donde se presenta el rendimiento del proceso entre cada etapa.

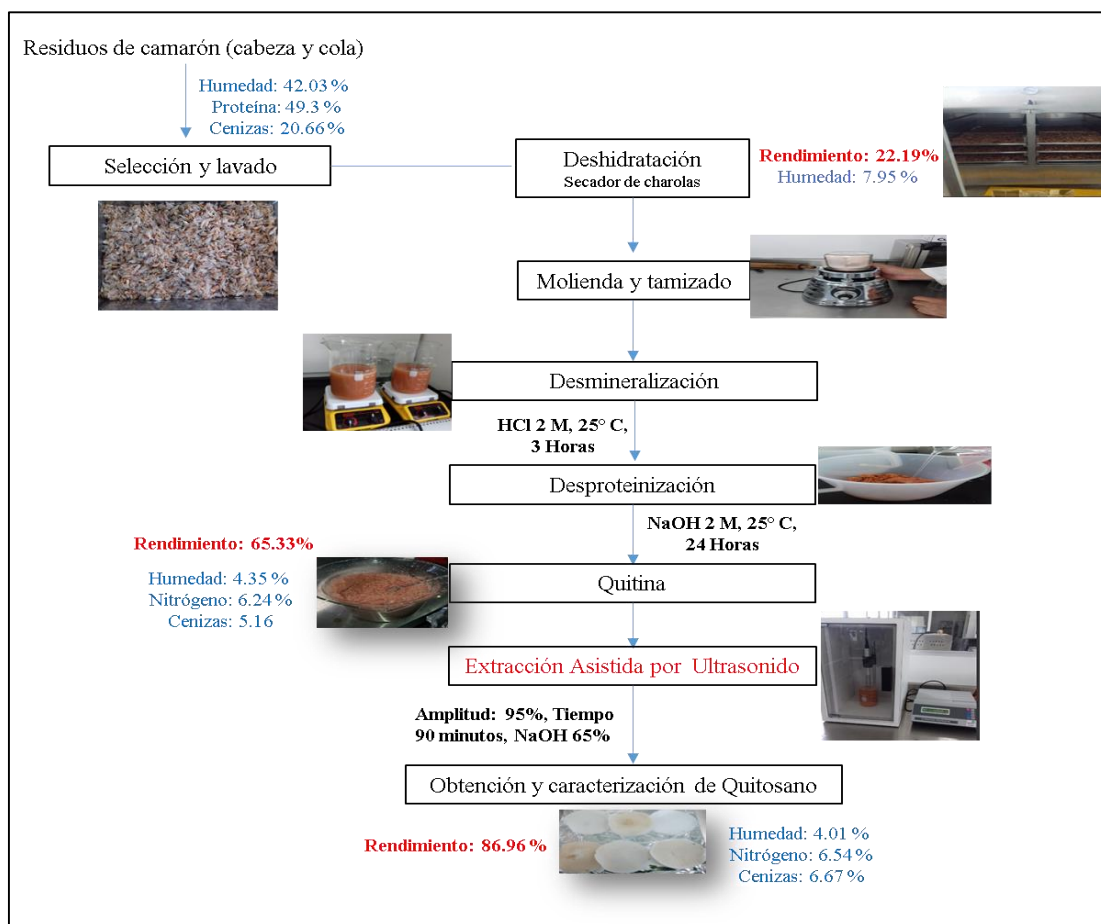


Figura 23. Diagrama de flujo del proceso de obtención de quitosano procedentes de residuos de camarón blanco (*Litopenneaus vanamei*) de acuerdo a las mejores condiciones de desacetilación asistida por ultrasonido.

En los apartados posteriores (8.2.1 – 8.2.4), se discutirán los resultados obtenidos para la realización de la etapa 2.

8.2.1. Diseño factorial 2³ para la obtención de quitosano asistida por ultrasonido

Durante la desacetilación de quitina asistida por ultrasonido, se evaluaron los efectos de concentración de NaOH, amplitud de irradiación y el intervalo de sonicación a través de un diseño factorial 2³. Por lo cual, se produjeron un total 8 tratamientos diferentes, sometiendo la suspensión de quitina a N-desacetilación asistida por ultrasonido en condiciones no isotérmica durante 90 min (tabla 13). La solubilidad del quitosano en ácido acético (1%) fue considerada como una medida de la eficiencia de desacetilación de quitina por ultrasonido, ya que de acuerdo a Thi, Duong & Dang (2017), una mayor solubilidad se encuentra asociada a un mayor eficiencia de desacetilación.

Tabla 13. Resultados de las pruebas de solubilidad realizadas a los diferentes tratamientos de quitosano asistido por ultrasonido mediante un diseño factorial 2³.

Tratamiento	(Código)	Factores			Respuesta
		Amplitud (%)	NaOH (%)	Intervalo (Min)	% de solubilidad ácido acético 1%
T1		75	50	5 – 5	13.42
T2		75	50	7.5 – 5	7.37
T3		90	50	5 – 5	42.8
T4		90	50	7.5 – 5	20.79
T5		75	65	5 – 5	98.8
T6		75	65	7.5 – 5	97.9
T7		90	65	5 – 5	100
T8		90	65	7.5 – 5	94.8
Quitosano sigma		---	---	---	100
Quitosano método convencional		---	50	300	58.72

Los tratamientos evaluados presentaron una gran variación sobre la solubilidad observada, cuyo intervalo de respuesta osciló entre el 7.37 % hasta alcanzar una solubilidad del 100%, comparable con la solubilidad obtenida para una muestra de quitosano comercial adquirido de Sigma-Aldrich. Por otro lado, los resultados del quitosano obtenidos por el método químico convencional, indicaron una solubilidad parcial (58.72%).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

El análisis de varianza de los resultados del estudio de desacetilación asistida por ultrasonido (tabla 14), indicaron que las 3 variables evaluadas presentaron efecto significativo ($p < 0.05$) sobre la solubilidad de los quitosanos obtenidos.

Tabla 14. Análisis de varianza para la determinación de solubilidad de los quitosanos obtenidos por ultrasonido

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Valor-p
Amplitud	118.58	1	118.58	0.0322
NaOH	12578.6	1	12578.6	0.0031
Intervalo	72.3605	1	72.3605	0.0412
Amplitud - NaOH	149.645	1	149.645	0.0287
Amplitud - Intervalo	12.9032	1	12.9032	0.0970
NaOH-Intervalo	17.5824	1	17.5824	0.0833
Error total	0.3042	1	0.3042	
Total (corr.)	12949.9	7		
$R^2 = 99.99\%$				
Error estándar = 0.551				

8.2.2. Influencia de las variables sobre la desacetilación asistida por ultrasonido

A partir del diagrama de Pareto (figura 24) se observó una mejora en la solubilidad del quitosano al incrementar la concentración de NaOH, tal como se ha reportado en la desacetilación química tradicional (Marcela et al. 2013).

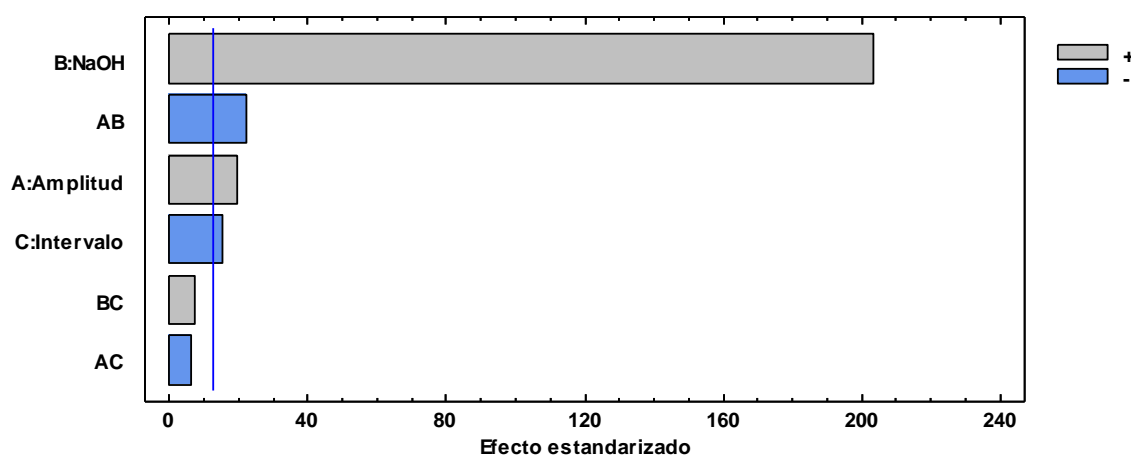


Figura 24. Diagrama de Pareto estandarizado para la respuesta de solubilidad de quitosano en ácido acético al

1%

La amplitud de radiación y el tiempo de sonicación demostraron un efecto positivo sobre el aumento de la solubilidad de las muestras. La desacetilación asistida por ultrasonido ha sido reportado como una técnica de obtención más eficiente comparada con el proceso convencional (Birolli et al. 2016; Thi, Duong & Nghia 2017), debido a que la irradiación incrementa la accesibilidad de los sitios reactivos a través del fenómeno de cavitación, induciendo a la fragmentación e hinchamiento de las partículas de quitina, aumentando el área de superficie de la partícula (Limem et al. 2016; Fiamingo et al. 2016). Otro mecanismo involucrado en el incremento de la eficiencia de desacetilación, es que este proceso permite la disminución de la concentración de oxígeno molecular durante la ejecución del proceso de sonicación, previniendo o minimizando la aparición de reacciones indeseables como la despolimerización oxidativa (Cardoso 2011).

8.2.3. Estudio de la dependencia temperatura vs. tiempo durante la desacetilación

Con el objetivo de evaluar el efecto del tiempo de sonicación sobre la temperatura del sistema se procedió a realizar un monitoreo de ambas variables durante la desacetilación (figura 25), de acuerdo a las mejores condiciones de desacetilación establecidas en el tratamiento T7. La tendencia observada indicó un incremento acelerado de la temperatura en los primeros 30 min de reacción y posteriormente, se observó un comportamiento casi constante, el cual se mantuvo por debajo de los 110 °C. Este dependencia fue reportada previamente por Birolli et al. (2016), quienes evaluaron la desacetilación de quitina bajo condiciones no isotérmicas.

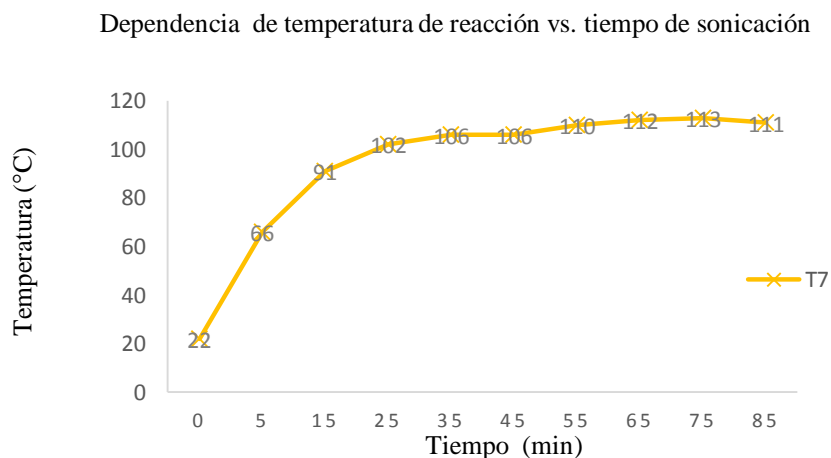


Figura 25. Dependencia de la temperatura con respecto al tiempo de irradiación de ultrasonido de acuerdo a las condiciones: 65% de NaOH, 90 % amplitud y un intervalo de sonicación de 5-5 min.

8.2.4. Caracterización fisicoquímica del quitosano obtenido por ultrasonido (QU)

Los resultados del proceso de desacetilación demostraron que el ultrasonido permitió un alto rendimiento en la conversión de quitina en quitosano (86.96%), con un porcentaje de nitrógeno y de cenizas del 6.52 y 6.67 %, respectivamente.

8.2.4.1. Determinación del DA del QU

El cálculo del DA del QU a partir de espectroscopia de RMN- H^1 (**anexo 3**), fue de 85.25%, el cual superó al obtenido para una muestra de quitosano comercial adquirido por Sigma (83.0 %). Las características del porcentaje de desacetilación del QU pueden atribuirse a la temperatura alcanzada durante el procesamiento ($<105\text{ }^\circ\text{C}$), así como por la influencia de los parámetros de ultrasonido como la amplitud y duración de la irradiación (Cardoso 2011).

8.2.4.2. Determinación del PM del QU

Los resultados obtenidos por SEC (**anexo 4**), reportaron que el PM del QU fue igual a 392 kDa, indicando que corresponde a un biopolímero de alto peso molecular (Pacheco et al. 2008). Los resultados sugieren que el proceso de irradiación redujo la despolimerización del quitosano, debido a que presentó un elevado PM.

8.2.4.3. Análisis del QU por IR-FT

Los espectros de IR-FT (figura 26) correspondientes a la muestra de QU comparado con el quitosano comercial (QS), presentaron una gran similitud con los espectros de quitosano encontrados en la literatura (Desbrie et al. 2001). Entre las bandas principales que se pueden apreciar destaca la banda a 1707 cm^{-1} asociada al estiramiento de $\text{C}=\text{O}$ procedente de la amida I, de igual manera se observaron bandas a 1571 y 1394 cm^{-1} atribuidas al estiramiento de los enlaces $\text{C}-\text{N}$ procedentes de la amida II y III, respectivamente; por su parte, la banda presente en 1034 cm^{-1} puede ser indicativo del estiramiento del enlace $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ (Ramin et al. 2016; Silva-Weiss et al. 2013; Kumari et al. 2015).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

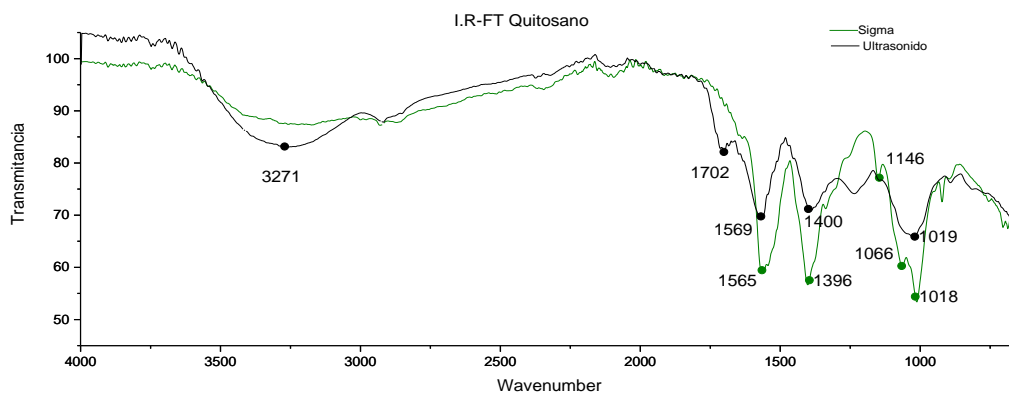


Figura 26. Espectros de quitosano de IR-FT obtenidos usando un espectrómetro Agilent Cary 630, en modo de reflectancia total atenuada.

8.2.4.3. Análisis del QU por difracción de rayos -X

Los patrones de difracción de Rayos X de QU y QS se presentan en la figura 27, en donde se observa que el patrón de difracción de rayos-X de ambas muestras presentaron dos picos definidos, uno de mayor intensidad a $2\Theta = 19.70^\circ$ y uno menor a 9.43° , que hacen referencia a un biopolímero semi-cristalino (Kumari et al. 2015; Fiamingo et al. 2016). Estos picos característicos han sido analizados previamente por Abdel-Rahman et al (2015), quienes atribuyen los picos a las distancias entre retículos a 4.6 y 2.6 °Å.

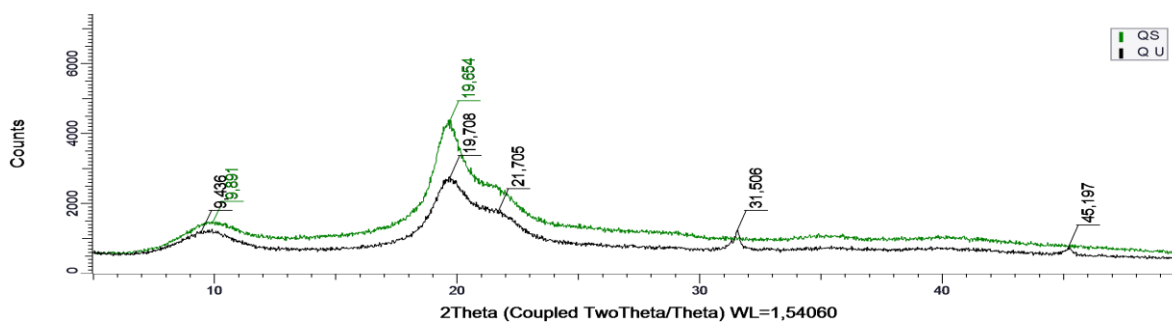


Figura 27. Patrones de difracción de Rayos X de QU y QS, obtenido mediante un difractómetro Bruker modelo D8 Advance

8.3. Etapa 3A: Formación de nanopartículas de quitosano por gelificación iónica

En esta etapa se realizó el estudio del efecto de los principales factores involucrados en el proceso de gelificación iónica durante la formación de Nps de quitosano, las cuales fueron

RESULTADOS Y DISCUSIONES

utilizadas como agentes portadores de los polifenoles extraídos de residuos de limón persa. Los factores intrínsecos evaluados fueron la concentración de quitosano, la relación con el agente reticulante (TPP), el pH; mientras que los factores del proceso fueron el tiempo de agitación y la implementación de ultrasonido. Las variables se evaluaron mediante un diseño factorial 2^{5-1} , buscando una reducción en el tamaño de partícula e índice de polidispersión y un incremento en la densidad de carga superficial (tabla 15).

Tabla 15. Potencial Z, tamaño de partícula e IPD de las Nps de quitosano preparadas bajo diferentes condiciones de formación por gelificación iónica mediante un diseño factorial 2^{5-1} .

Código	Factor					Respuesta		
	pH	Q-TPP (V/V)	Quitosano (%)	Tiempo (h)	Sonicación (5 min)	Potencial Z (mV)	Tamaño (d nm)	IPD
1	4.5	7:1	0.2	1	No	37.9±2.75	251.1±10.68	0.454±0.1
2	4.5	3:1	0.1	1	No	21.7±0.35	123.3±3.07	0.221±0.02
3	5.5	7:1	0.1	2	Si	19.1±0.50	136.3±1.95	0.196±0.01
4	4.5	3:1	0.2	1	Si	35.3±3.79	117.5±0.40	0.312±0.05
5	4.5	7:1	0.2	2	Si	31.8±3.41	161.1±5.37	0.439±0.02
6	5.5	7:1	0.2	1	Si	24.8±4.34	216.7±7.31	0.210±0
7	4.5	7:1	0.1	2	No	34.5±0.70	158.0±6.46	0.329±0.04
8	4.5	3:1	0.2	2	No	36.0±2.40	193.7±8.92	0.404±0.02
9	5.5	7:1	0.1	1	No	22.2±1.15	124.9±4.04	0.218±0
10	5.5	7:1	0.2	2	No	28.2±1.85	197.4±3.95	0.303±0.02
11	5.5	3:1	0.2	2	Si	21.8±0.79	161.2±2.87	0.440±0.01
12	4.5	3:1	0.1	2	Si	29.0±2.46	91.1±1.64	0.233±0.01
13	5.5	3:1	0.1	1	Si	16.1±2.11	99.1±2.19	0.197±0.02
14	4.5	7:1	0.1	1	Si	27.7±1.50	117.3±2.67	0.301±0.01
15	5.5	3:1	0.2	1	No	19.3±1.85	104.7±0.97	0.224±0.01
16	5.5	3:1	0.1	2	No	15.6±0.87	143.8±0	0.152±0

Los datos son valores promedio ± SD (n=3).

Los resultados del análisis de varianza de la tabla 16 indicaron un efecto significativo para las tres variables de respuesta ($p < 0.05$), reportando ajustes superiores al 90% para todos los casos, por lo que los tres modelos fueron considerados como aceptables. De acuerdo al criterio de deseabilidad establecido para las variables de respuesta (menor tamaño e IPD y mayor densidad

de carga), el tratamiento que ofreció las mejores características para la elaboración de nanopartículas fue el tratamiento número 4.

Tabla 16. Análisis de varianza de los resultados obtenidos a partir del proceso de gelificación iónica.

Modelo	Tamaño (d nm)	Potencial Z (mV)	IPD
P-valor	0.0000	0.0000	0.0000
R-cuadrado	99.23	95.91	91.39
Adj. R-cuadrado	98.91	94.35	88.76

8.3. 1. Análisis sobre el tamaño de partícula

El tamaño de las Nps es uno de los parámetros de mayor importancia, ya que determina la aplicación y destino del biocompuesto formulado (Gan et al. 2005). En la figura 28, se presenta el diagrama de Pareto correspondiente a dicha variable, en donde se observa que todos los factores evaluados presentaron efecto significativo, de los cuales: la relación de Q-TPP y la sonicación causaron una mayor influencia sobre la variable analizada.

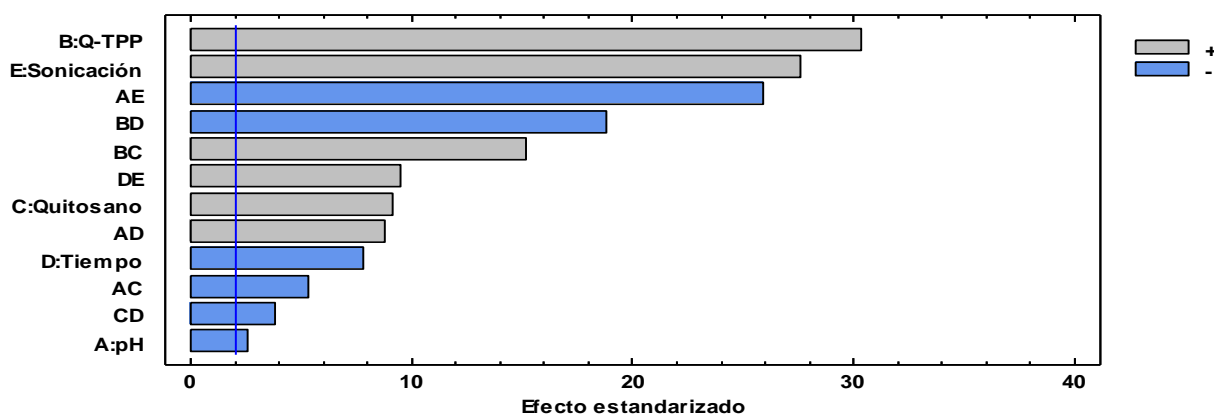


Figura 28. Diagrama de Pareto estandarizado para la respuesta de tamaño

Los valores reportados para el tamaño de partícula (tabla 15) oscilaron en el intervalo de 91.1 ± 1.64 a 251.1 ± 10.68 nm. Estos resultados presentaron una disminución en la respuesta al disminuir la cantidad de TPP, es decir al incrementar la relación de Q-TPP (de 3:1 a 7:1), tal y como se reportó por Pinho Neves et al (2014). La relación de Q-TPP es un factor crucial durante la gelificación iónica, puesto que una mayor cantidad de TPP (Q-TPP 3:1) puede dar lugar a la formación de un mayor número de partículas reticuladas, sin embargo, estas pueden aglomerarse

para formar un clúster, responsable de reportar un mayor tamaño de partícula global, lo que podría explicar la tendencia observada (Konecsni et al. 2012).

Los resultados demostraron que el ultrasonido presentó un efecto positivo en la reducción del tamaño, estos resultados coinciden con el estudio realizado por Li & Huang (2012), quienes evaluaron el efecto de la cavitación sobre las Nps de quitosano obtenidas por gelificación iónica. De acuerdo a Floris et al. (2013) el ultrasonido permite romper los agregados formados, lo que reduce el tamaño y la polidispersión de las Nps. Estos autores señalan que incluso el efecto de ultrasonido puede llevar a cabo diferentes mecanismos de degradación de las moléculas causada por efecto de cavitación, resultando en fragmentos más pequeños.

A valores bajos de pH las cadenas de quitosano presentan una conformación extendida debida a la completa protonación de los grupos amino lo que favorece la reticulación iónica conduciendo a la formación de estructuras más compactas (Casagrande et al. 2015). Lo anterior puede explicar la reducción en el tamaño de partícula en función a la disminución del pH.

8.3. 2. Análisis sobre el potencial Z

El potencial Z se define como el grado de repulsión entre partículas adyacentes en una dispersión (Madureira et al. 2016), por lo tanto la reducción en el potencial Z de las Nps podría asociarse a la neutralización de la densidad electrónica del quitosano al interactuar con los iones aniónicos del TPP (Nallamuthu et al. 2015).

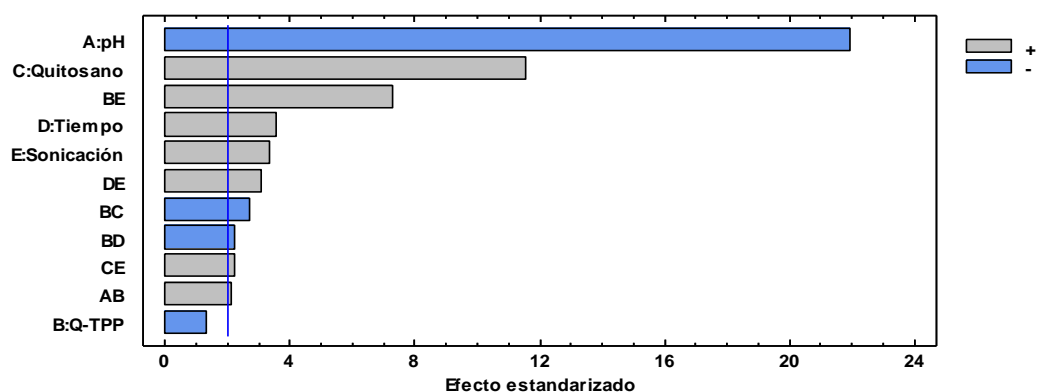


Figura 29. Diagrama de Pareto estandarizado para la respuesta de potencial Z

Al analizar el diagrama de Pareto para el potencial Z (figura 29), se observa que los factores que causaron mayor efecto fueron el pH y la concentración del quitosano. El intervalo del potencial

Z osciló de 16.1 ± 2.11 , a 37.9 ± 2.75 , indicando que todas las Nps presentaron una carga global positiva. De acuerdo a Callaghan & Kerry (2016) las Nps con un potencial Z mayor de ± 30 mV son consideradas como estables, debido a que existe suficiente fuerza repulsiva presente para evitar la agregación entre las partículas. Lo anterior sugiere que las nanopartículas presentaron estabilidad de moderada (< 30 mv) a altamente estables (>30).

El mayor potencial Z observado a concentraciones elevadas de quitosano, puede atribuirse a la mayor cantidad de grupos NH^{+3} en el sistema, los cuales se encuentran directamente relacionados con la densidad de carga positiva de las Nps. Lo anterior, puede explicar porque un aumento en la relación de Q-TPP reporta también valores altos de potencial Z, debido a la menor neutralización de los grupos NH^{+3} por los grupos aniónicos de TPP (Pulicharla et al. 2016). Así mismo, se observó que valores bajos de pH induce a un incremento en el potencial Z. Esta dependencia se atribuye a que en un medio ácido, los grupos amino del quitosano se encuentran cargados positivamente, confiriendo al polisacárido una alta densidad de carga, favoreciendo que el quitosano interaccione con el TPP mediante un entrecruzamiento inter e intra molecular (Dudhani & Kosaraju 2010).

8.3.3. Análisis sobre el índice de polidispersión

El IPD es un valor que describe la distribución del tamaño de una muestra. Un IPD igual a 1 expresa que la muestra presenta una distribución muy amplia y variable de tamaño (Callaghan & Kerry 2016).

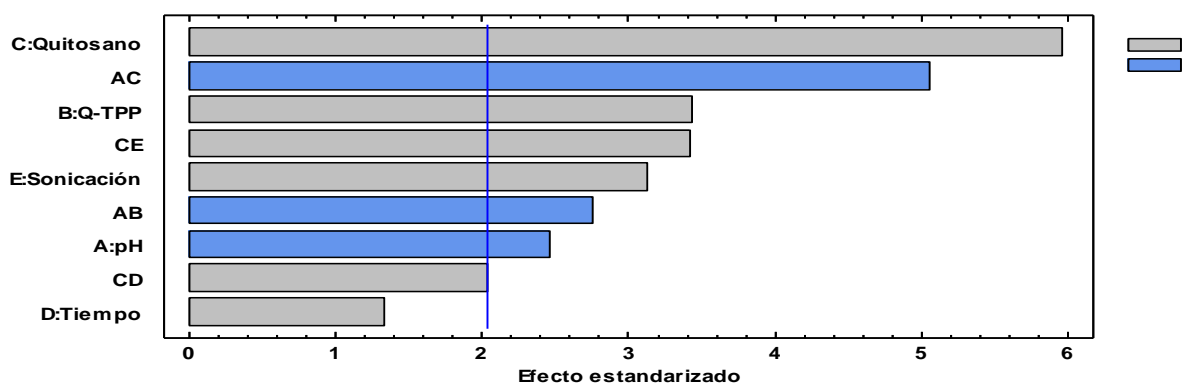


Figura 30. Diagrama de Pareto estandarizado para la respuesta de IPD

El análisis de Pareto (figura 30) indicó que los factores significativos fueron el pH, la concentración de quitosano y la interacción entre los mismos, reportando valores en el intervalo de 0.152 ± 0 a 0.454 ± 0.01 . Con respecto a la sonicación también presentó efecto significativo ($p > 0.05$); diversos autores han señalado que esta técnica resulta de gran utilidad, ya que permite deshacer agregados, reduciendo además del tamaño, el IPD mediante la escisión de las cadenas de los enlaces 1,4-glicosídicos, sin afectar el grado de desacetilación del biopolímero (Zorzi et al. 2015; Ramos-ponce et al. 2010). De acuerdo a Lange et al. (2014), valores de IPD por debajo de 0.3 indican alta homogeneidad en el tamaño de las partículas en la dispersión, por lo que los tratamientos en donde el valor de IPD fue superior a 0.3 fueron descartadas como condiciones ideales de formulación.

8.4. Etapa 3B: Encapsulación de polifenoles

El presente estudio planteó el análisis de la interacción entre las Nps de quitosano con un extracto polifenólico procedente de residuos de limón persa, evaluando el efecto de las características fisicoquímicas del sistema sobre el rendimiento de encapsulación y posterior liberación, analizando además, la actividad antibacteriana y antioxidante de los compuestos formulados.

Para el estudio se evaluaron 4 formulaciones diferentes de Nps de quitosano (tabla 17), las cuales se establecieron en función a las condiciones determinadas en la etapa 8.3, bajo el criterio de emplear nanopartículas de menor tamaño y mayor densidad de carga (Formulación A y C). Durante el análisis se emplearon también Nps que presentaron tendencias contrarias, es decir mayor tamaño y menor densidad de carga (Formulación B y D). Como medida de control, se realizó además la encapsulación del extracto polifenólico empleando Nps de quitosano comerciales (Sigma, de bajo peso molecular). La concentración del extracto polifenólico se fijó a $703.07 \mu\text{g/mL}$. Una vez obtenidas las nanopartículas cargadas con el extracto polifenólico, se sonicaron durante 5 minutos a una amplitud de onda del 50%.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Tabla 17. Condiciones seleccionadas para la elaboración de Nps de quitosano cargadas con polifenoles procedentes de limón persa

Formulación	Descripción			
	pH	Quitosano (%)	TPP (%)	Q-TPP (V/V)
Cap-A	4.5	0.20	0.10	3:1
Cap-B	5.5	0.20	0.10	7:1
Cap-C	4.5	0.50	0.25	3:1
Cap-D	5.5	0.50	0.25	7:1
Cap-Control	5.5	0.50	0.25	7:1

8.4.1. Eficiencia de encapsulación

Los resultados para el %E-Cap, indican que existió diferencia estadística significativa para cada uno de los polifenoles presentes en el extracto, así como para el contenido de polifenoles totales, al comparar los resultados de las 5 formulaciones evaluadas.

Tabla 18. Resultados del % E-Cap de los polifenoles encapsulados con Nps de quitosano

Formulación	% E-Cap individual para cada polifenol presente en el extracto					Polifenoles totales
	Ácido clorogénico	Ácido cafeico	Eriocitrina	Ácido elágico	Hesperidina	
Cap-A	21.64± 0.20 ^a	58.13±0.19 ^a	59.42±0.02 ^a	60.57±1.57 ^b	37.65±0.12 ^a	47.48 ± 0.34 ^a
Cap-B	21.32 0.50 ^a	59.4± 0.14 ^b	60.05±0.83 ^a	82.64± 1.36 ^d	42.10±0.10 ^c	53.11 ± 0.24 ^c
Cap-C	22.98±0.54 ^b	58.56±0.59 ^a	59.43±1.11 ^a	81.92±2.09 ^d	42.39±0.07 ^d	53.06 ± 0.25 ^c
Cap-D	21.18± 0.60 ^a	57.65± 0.52 ^a	59.97±0.91 ^a	73.09±0.00 ^c	40.95±0.03 ^b	50.57 ± 0.38 ^b
Cap-Control	56.82± 3.78 ^c	73.73±0.23 ^c	72.97±0.00 ^b	0 ± 0.00 ^a	63.92±0.05 ^e	75.95 ± 0.03 ^d

Valores en la misma columna con diferentes letras indican que son significativamente diferentes (P <0.05). Los datos son valores promedio ± SD (n=3).

El intervalo del % E-Cap por polifenol individual fue de 21.18%-73.735%, encontrándose dentro de los valores reportados para la encapsulación de diversos compuestos polifenólicos empleando Nps de Quitosano. Entre los compuestos encapsulados podemos citar el ácido

clorogénico con una E-Cap del 48-59% (Nallamuthu et al. 2015), el ácido elágico con E-Cap del 30-50% (Gopalakrishnan et al. 2014), el ácido gálico con E-Cap del 59-85% (Lamarra et al. 2016), el ácido ferúlico con E-Cap del 14.71-56.45 % (Panwar et al. 2016) y curcumina con E-Cap del 62.36-72.99% (Parize et al. 2012). Las diferencias observadas en cuanto al % E-Cap de cada analito se atribuyen a las diferentes polaridades de los compuestos, debido a que la polaridad influye sobre el equilibrio entre las fuerzas asociativas-repulsivas entre los compuestos polifenólicos y las cadenas de quitosano. Por lo tanto, el bajo % E-Cap observado para el ácido clorogénico puede asociarse con la diferencia en hidrofiliidad entre el quitosano y el compuesto polifenólico, altamente hidrofóbico (Gopalakrishnan et al. 2014). Helal et al. (2015) señalan que además de la polaridad, el peso molecular de los compuestos polifenólicos también puede influenciar en el proceso de retención en una matriz polimérica.

Por otro lado, los resultados del % E-Cap del contenido total de polifenoles para las formulaciones oscilaron entre 47.48-53.50 %, valores similares a los reportados por Pulicharla et al. (2016) (42.35-58.48 %), quienes realizaron la encapsulación de compuestos polifenólicos de fresa empleando Nps de quitosano.

De acuerdo al análisis de varianza, los tratamientos que reportaron menor E-Cap total fueron las formulaciones Cap-A y Cap-D. Esta tendencia ha sido previamente reportada por Parize et al. (2012), quienes sugirieron que un incremento en el número de grupos fosfato está asociado con % E-Cap más bajos, debido a la reducción de la cantidad de grupos amino de quitosano que pueden interactuar con los compuestos bioactivos.

8.4.2. Eficiencia de liberación

Los resultados para la eficiencia de liberación (%E-Lib) de la formulación Cap-D se presentan en la figura 31, en donde se evaluó el efecto de 3 medios diferentes: ácido acético 1% (pH: 2.80), buffer fosfato (pH: 7) y cloruro de calcio 1% (pH: 5.12).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

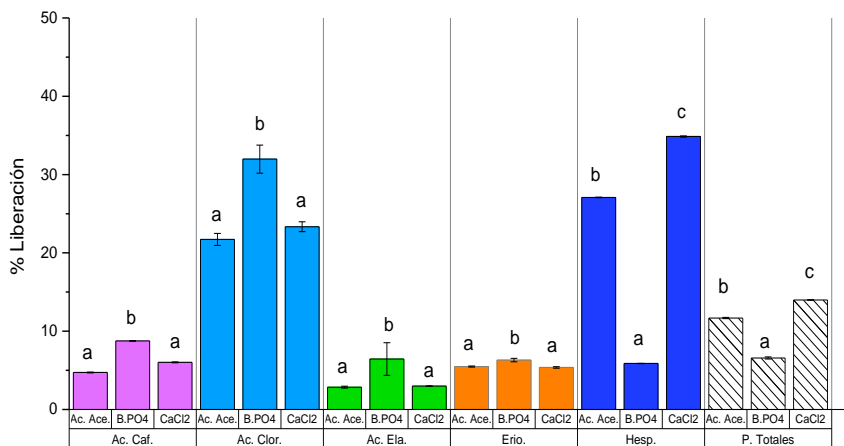


Figura 31. Resultados del % E-Lib para la formulación D. Valores en la misma columna con diferentes minúsculas indican que son significativamente diferentes ($P < 0.05$). Los datos son valores promedio \pm SD ($n=3$).

Los resultados indican que el pH del medio influyó significativamente en el perfil de liberación de los compuestos polifenólicos, siendo el CaCl_2 el medio que presentó mayor % E-Lib. Estos resultados pueden asociarse con la gran capacidad de hinchamiento que presentan las partículas reticuladas de quitosano en CaCl_2 (Sunny et al. 1992). Lo anterior se debe al efecto plastificante del CaCl_2 , el cual disminuye la cristalinidad del biopolímero, ayudando a su mayor solubilidad de los encapsulados (Jiang et al. 2012; Leharne et al. 2011). Por otro lado, la menor % E-Lib del ácido acético puede atribuirse a que se ha reportado que a valores bajos de pH se incrementan las fuerzas de interacción entre los polifenoles y el quitosano (Popa et al. 2000), lo que dificultaría el proceso de liberación.

Los resultados obtenidos no superaron el 15 % E-Lib. Estos resultados fueron similares a los reportados por Kumar et al. (2015), quienes señalan que un bajo % E-Lib ($\sim 15\%$) está relacionado con una gran capacidad de las nanopartículas de quitosano para retener altas cantidades de compuestos polifenólicos, incrementado de esta manera la biodisponibilidad del compuesto. En este contexto, Helal et al. (2015) también observaron que bajas tasas de liberación se encuentra relacionados con altas tasas de retención de los compuestos polifenólicos, lo que podría explicar porque la mayoría de los compuestos polifenólicos de carácter más hidrofílicos presentaron % E-Lib más bajas, a diferencia del ácido clorogénico, que presentó mayor % E-Lib, al ser el compuesto polifenólico de mayor hidrofobicidad.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Con el objetivo de evaluar el % E-Lib de las 4 formulaciones, se decidió liberar cada una de ellas en CaCl_2 , debido a que presentó el mayor % E-Lib de los tres medios (figura 32).

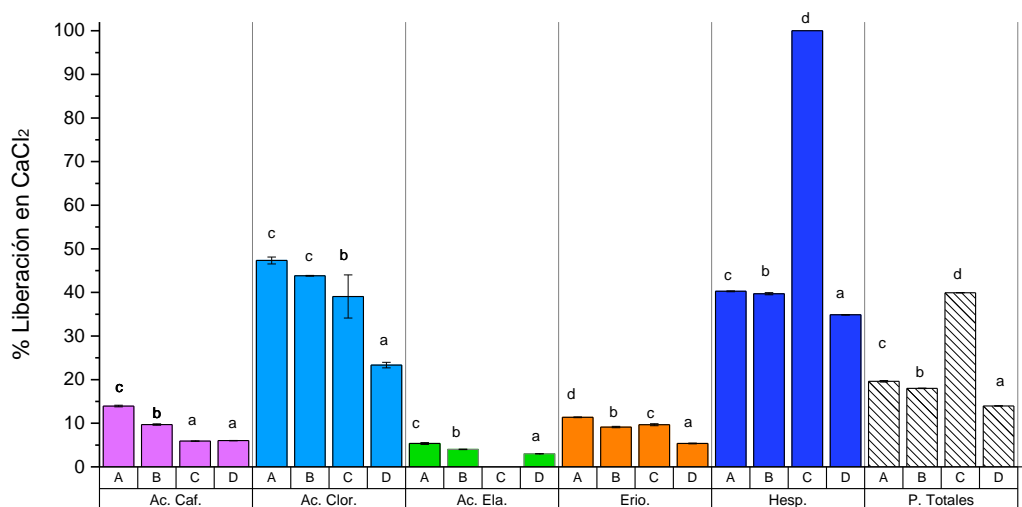


Figura 32. Resultados del % E-Lib en CaCl_2 . Valores en la misma columna con diferentes letras minúsculas indican que son significativamente diferentes ($P < 0.05$). Los datos son valores promedio \pm SD ($n=3$).

Diversos estudios reportan la formación de películas activas basados en la combinación de quitosano con compuestos polifenólicos, sin la adición de un agente reticulante (Qin et al. 2010; Iturriaga et al. 2014; Wang et al. 2013), lo que podría parecer una ventaja al disminuir el uso de reactivos empleados. Sin embargo, estos films pueden ser degradados por acción de enzimas pancreáticas, por lo que la adición de un agente reticulante como el TPP podría mejorar la estabilidad de los encapsulados (Zhang & Zhao 2015). La evaluación del efecto de la concentración de Quitosano y TPP, el pH, así como la relación quitosano-TPP, proporciona información de gran importancia, debido a que la eficiencia de encapsulación/liberación se encuentra ligada a estas variables (Ajun et al. 2009; Kouchak 2015).

La densidad de reticulación es una de las principales variables que influye en los perfiles de liberación, puesto que el aumento de la reticulación impide el hinchamiento de los encapsulados en el medio de disolución y con ello, la difusión de los compuestos activos, dando como resultado una velocidad de liberación más baja (Sunny et al. 1992). Esto podría explicar porque las formulaciones Cap-A, Cap-B y Cap-D presentaron % E-Lib más bajas, ya que los valores del potencial Z para estas formulaciones fueron negativos, indicando una mayor reticulación

como consecuencia de una mayor neutralización de las cargas positivas del quitosano. Por el contrario, el mayor % E-Lib de la formulación Cap-C, puede asociarse con el valor mayor potencial Z reportado para este tratamiento (6.27 mv), lo que sugiere un menor índice de reticulación.

El análisis de resultados de las figuras 31 y 32 indicaron que el tamaño de los encapsulados también presentó efectos significativos en el % E-Lib. De acuerdo a Sunny et al. (1992) las partículas de menor tamaño favorecen una disolución más rápida del compuesto bioactivos, debido a la mayor área de contacto con el medio de disolución. Los resultados de la figura 32 reportan que el tratamiento Cap-C fue el que presentó menor tamaño de partícula (159.63 nm), por lo que podemos relacionar este valor con la mayor % E-Lib.

Puesto que la liberación de compuestos a partir de nanopartículas de quitosano tiene lugar a partir de varios mecanismos, incluyendo la erosión de superficie, la desintegración, difusión y desorción (Dudhani & Kosaraju 2010), sería interesante realizar un estudio más profundo para determinar el mecanismo y la cinética de liberación involucrados.

8.5. Etapa 4: Caracterización fisicoquímica de los encapsulados

8.5.1. Análisis de los encapsulados por IR-FT

El análisis por IR-FT (figura 33) fue empleado con el objetivo de observar posibles interacciones entre el quitosano, el TPP y los compuestos polifenólicos, mediante cambios en las bandas espectrales características de cada uno de ellos (Wang et al. 2013).

Se ha reportado que los desplazamientos de las bandas correspondientes a los grupos funcionales amida I y II, son una fuerte evidencia de la interacción entre el quitosano y el TPP (Ramin et al. 2016; Lamarra et al. 2016). Al observar el espectro del quitosano reticulado con TPP, con respecto al quitosano sin reticular, se puede apreciar un desplazamiento en el pico correspondiente a la amida secundaria de 1571 cm^{-1} a 1565 cm^{-1} , así como la aparición de un nuevo pico a 807 cm^{-1} , asociado a la presencia de grupos fosfatos (P-O, P=O), lo cual podría ser una evidencia de la interacción electroestática entre los iones amonio del quitosano y los iones fosfóricos del TPP (Woranuch & Yoksan 2013a; Floris et al. 2013).

Los espectros de las formulaciones presentan la aparición de bandas a 2372 cm^{-1} para la formulación D y una banda a 2352 cm^{-1} para la formulación control, cuya presencia e intensidad

podría ser un indicativo de la interacción entre los compuestos polifenólicos con las Nps de quitosano, tal como indican Woranuch & Yoksan (2013a); Wang et al. (2013).

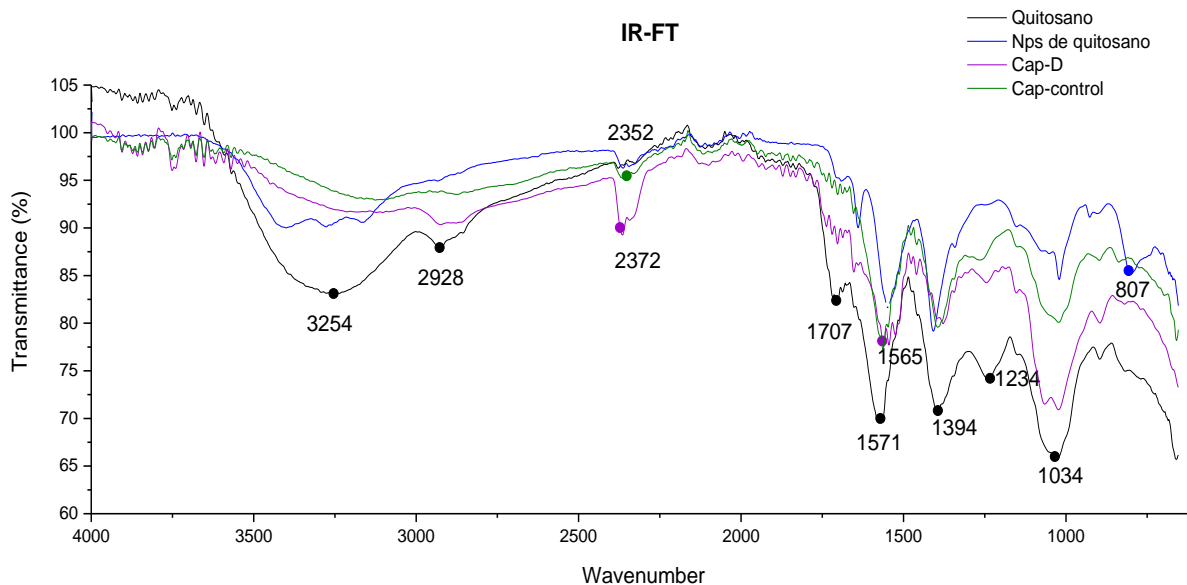


Figura 33. Espectro de IR-FT de quitosano, Nps de quitosano, Cap-D y Cap-control. Obtenidos usando un espectrómetro Agilent Cary 630, en modo de reflectancia total atenuada.

8.5.2. Análisis de los encapsulados por difracción de rayos -X

En las figuras 34 y 35 se muestran los patrones de difracción de Rayos-X del QU, las Nps de quitosano (formulación D) y las Nps cargadas con los compuestos polifenólicos.

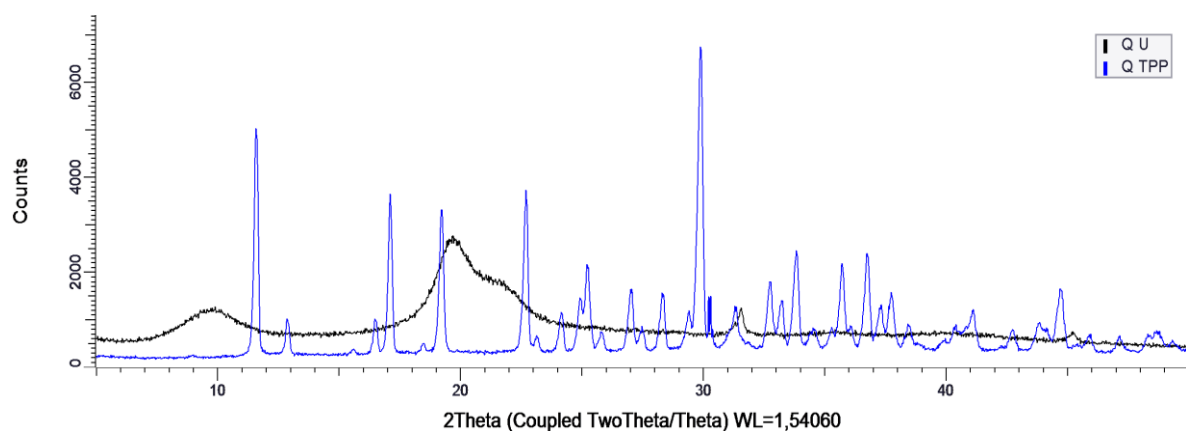


Figura 34. Patrones de difracción de Rayos X de QU y Nps de quitosano (Q-TPP)

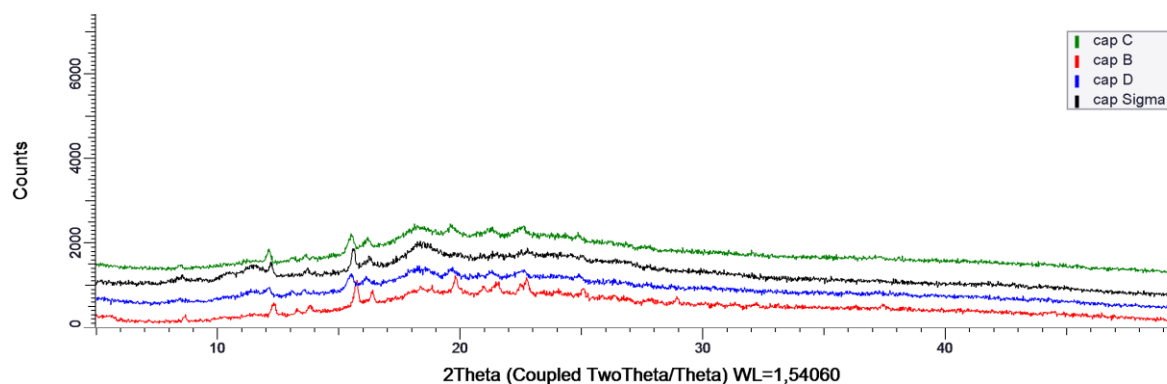


Figura 35. Patrones de difracción de Rayos X de las formulaciones B, C, D y el control

El análisis de los patrones de difracción de la figura 34 sugiere cambios en la cristalinidad del quitosano después de formar las Nps reticuladas, ya que el difractograma correspondiente a las Nps, presentó la aparición de una gran cantidad de picos en el rango de $2\Theta = 10-30^\circ$, sugiriendo un incremento en la cristalinidad. Esta tendencia también ha sido antes reportada en el estudio realizado por S. Tripathi, G.K. Mehrotra (2009), quienes reportaron que la reticulación de quitosano-PVA con glutaraldehído conlleva a una estructura más cristalina con respecto al quitosano sin reticular.

La cristalinidad de las Nps de quitosano disminuyó tras la adición del extracto polifenólico, por lo que los encapsulados fueron considerablemente más amorfos. Lo anterior podría indicar que los compuestos polifenólicos provocaron una estructura más desordenada en la alineación de las cadenas poliméricas del quitosano (Qi et al. 2004). La disminución de la cristalinidad observada en las formulaciones evaluadas puede ser atribuida a la ruptura del enlace de hidrógeno entre los grupos amino y los grupos hidroxilo en el quitosano, dando como resultado una estructura menos cristalina (Anon 2003).

8.5.3. Análisis de los encapsulados por DSC

El análisis por DSC permite determinar la temperatura de transición de fase en un intervalo dado de temperatura (Zhang & Zhao 2015). A continuación, se presenta en la figura 36 los termogramas obtenidos por DSC, correspondientes al tercer ciclo de calentamiento y enfriamiento de las muestras, con el objetivo de eliminar el efecto de la humedad (Sakurai et al. 2000).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

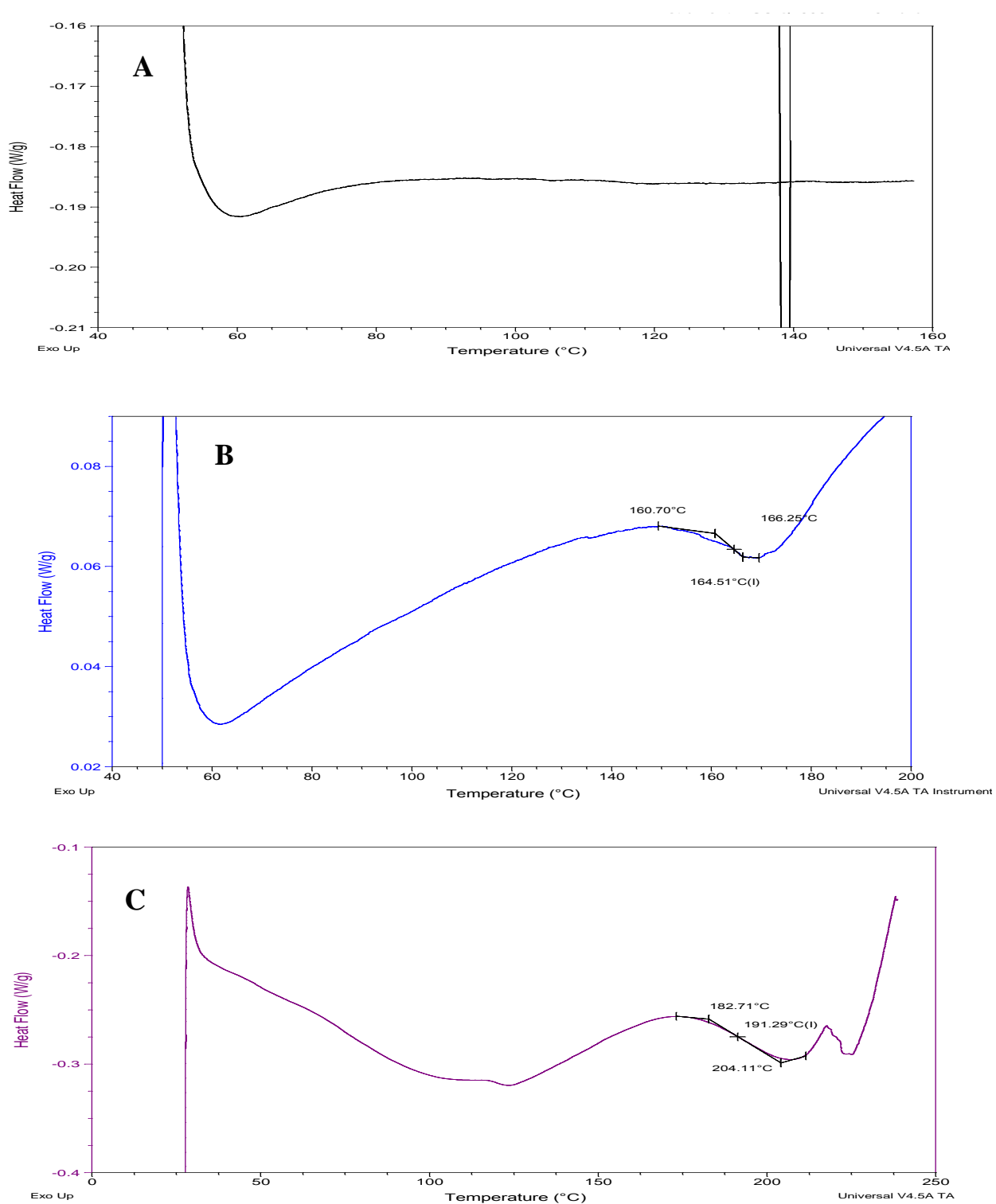


Figura 36. Curvas DSC de quitosano (A), Nps de quitosano (B), Cap-A (C). Las curvas fueron obtenidas mediante un equipo Q-2000 (TA Instruments) a una velocidad de calentamiento programada de 10 °C/min.

Para la muestra de quitosano (figura 36 A) no se pudo estimar el valor de Tg, debido a que no se observó el cambio de inclinación de la línea de base del termograma. Este comportamiento puede deberse a la higroscopicidad del quitosano, debido a que se trata de un compuesto parcialmente cristalino, así mismo, puede atribuirse al reducido volumen de las cadenas poliméricas (Dong et al. 2004). La determinación del valor de tg del quitosano por DSC ha sido descrita por Dong et al (2004) como medida confusa, puesto que se han reportados valores de tg en el intervalo de 150-220 °C. Por lo cual, Dhawade & Jagtap (2012) ha propuesto emplear técnicas más avanzadas de análisis térmico, como la calorimetría de barrido diferencial con modulación de temperatura, que implica la superposición de una modulación en el programa de temperatura lineal convencional, permitiendo la separación de la señal de flujo de calor total en su capacidad de calor y componentes cinéticos, estos son conocidos como los flujos de calor reversible y no reversible respectivamente.

Por otro lado, las Nps de quitosano (figura 36 B) mostraron una banda endotérmica alrededor de 60 °C, lo que indica una pérdida de agua ligada, provocando la aparición de la fusión (Panwar et al. 2016). De igual manera se puede apreciar un ligero cambio en la línea de base del termograma en el intervalo de temperatura de 140-170 °C, a partir de esta variación se determinó el valor de Tg, el cual fue igual a 164.51 °C, encontrándose dentro del intervalo de temperatura (146-156 °C). reportado por Gierszewska-Drużyńska (2010).

Por su parte, el compuesto Cap-A (figura 36 C) mostró un comportamiento térmico diferente en comparación con la muestra de las Nps de quitosano, presentándose un cambio en la banda ancha comprendida de 50 a 160 °C. Así mismo se observó el desplazamiento del valor de Tg (191.29 °C). Lo anterior podría demostrar el éxito de la encapsulación del extracto polifenólico (Lee et al. 2014). Comportamientos similares han sido reportados en el estudio de la encapsulación de catequina (Dudhani & Kosaraju 2010) y ácido clorogénico (Nallamuthu et al. 2015), en donde los cambios observados fueron atribuidos a la interacción de quitosano con los compuestos polifenólicos.

8.5.4. Análisis de los encapsulados por TGA

El TGA es una técnica utilizada para evaluar la estabilidad térmica de una muestra a través del estudio del cambio de peso función de la temperatura (Fakhreddin et al. 2013).

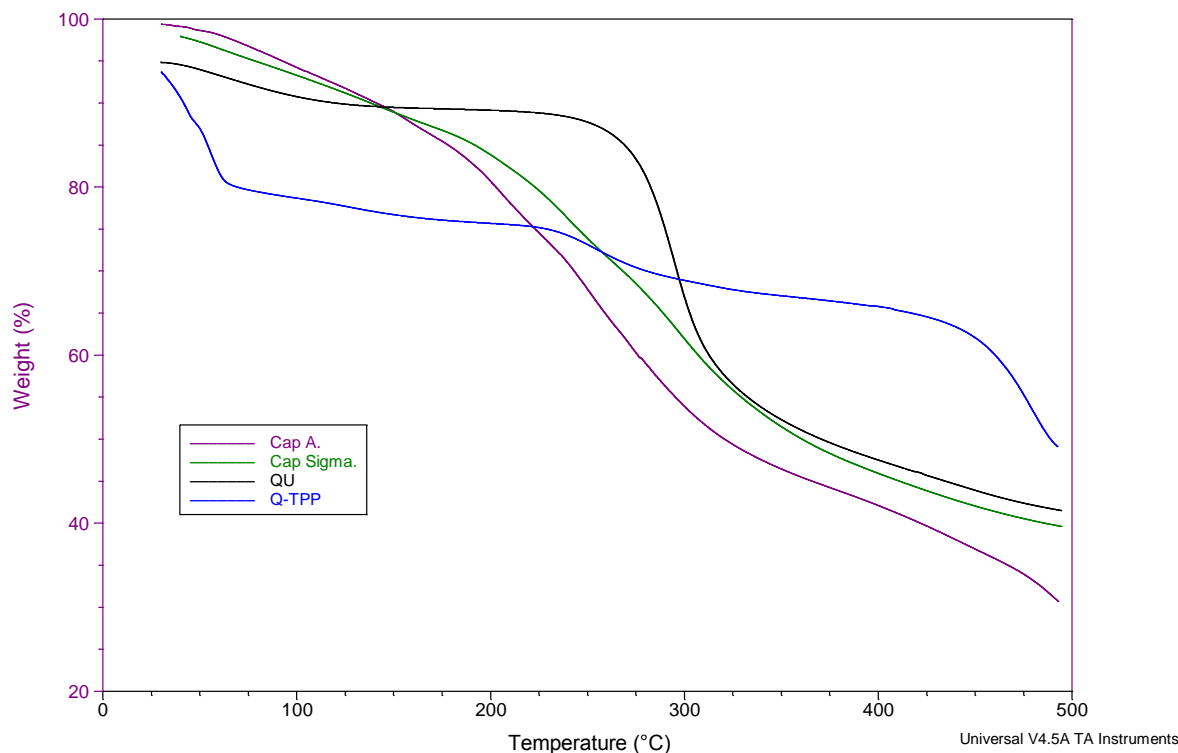


Figura 37. Curvas TGA de quitosano, Nps de quitosano, Cap-A y Cap-control. Las curvas fueron obtenidas mediante un equipo TGA Q500 (TA Instruments) a una velocidad de calentamiento programada de 10 °C/min.

La curva TGA (figura 37) del quitosano presentó dos pérdidas de peso significativas, una pérdida de peso a 40-120 °C atribuida a la vaporización de humedad y una segunda pérdida en el intervalo de 170-300 °C debida a la degradación térmica del polímero, correspondiente a una pérdida del peso total del 50% al alcanzar los 500 °C (Woranuch & Yoksan 2013b). Por otro lado, al analizar la curva de las Nps de quitosano, se observaron cambios en el comportamiento de degradación térmica con respecto al quitosano sin entrecruzar, observando una reducción en la estabilidad térmica en el intervalo de 25-150 °C. La pérdida de peso observada a partir de 200 °C puede asociarse con la degradación térmica del compuesto (Anbinder et al. 2011).

Las Curvas TGA de los tratamientos encapsulados (Cap-A y Cap-control) presentaron un proceso de descomposición en dos etapas. Para la primera etapa (25-150 °C) se observó que ambas formulaciones mostraron comportamientos similares, ya que ambas perdieron aproximadamente 10% de su peso inicial, lo que se atribuye a la eliminación de agua ligeramente unida a las cadenas poliméricas del quitosano (Cardoso 2011). La segunda etapa comprendida de 190 a 300 °C fue asignada a la despolimerización y la descomposición de las unidades acetilados y desacetilados del quitosano (Fakhreddin et al. 2013). El peso restante para Cap-A y Cap-control fue de 40% y 35 %, respectivamente, indicando que las formulaciones fueron moderadamente termoestables (Zhang & Zhao 2015).

8.5.5. Tamaño, Potencial Z e IPD de los encapsulados

Este estudio se realizó con el objetivo de evaluar el efecto de la interacción de las Nps con el extracto polifenólico sobre el tamaño y la densidad de carga. De acuerdo al análisis de varianza de la tabla 20, se observó que hubo un efecto significativo para las tres variables de respuesta ($p < 0.05$).

Tabla 19. Resultados de la determinación del tamaño de partícula, potencial Z e IPD para los compuestos polifenólicos encapsulados.

Formulación	Tamaño (d nm)	Potencial Z (mv)	IPD
Cap-A	267.67 ±9.09 ^c	-5.25 ±0.37 ^b	0.300±0.05 ^b
Cap-B	343.43 ±5.97 ^e	-9.30 ±0.33 ^a	0.410±0.08 ^c
Cap-C	159.63 ±5.52 ^a	6.27 ±0.06 ^c	0.240±0.03 ^{ab}
Cap- D	317.60 ±11.20 ^d	-5.21 ±1.04 ^b	0.500±0.01 ^d
Cap-Control	228.16±10.07 ^b	-3.76±0.28 ^b	0.182± 0.06 ^a

Valores en la misma columna con diferentes letras indican que son significativamente diferentes ($p < 0.05$). Los datos son valores promedio ± SD (n=3).

Al comparar los resultados de la tabla 15 con la tabla 19, se observó una reducción en el tamaño de las Nps tras realizar la encapsulación de los compuestos polifenólicos. Zhang & Zhao (2015), señalan que este fenómeno puede deberse a la disminución de la densidad electrónica después de la adición del extracto polifenólico, dando como resultado un incrementando en la deslocalización de los electrones, minimizando la agregación de las partículas y, por ende, la

disminución del tamaño del complejo. Por su parte, los valores encontrados para los encapsulados oscilaron en el intervalo de 159-353 nm, observando un aumento en la respuesta de interés al incrementar la relación Q-TPP de la formulación, lo que coincide con el estudio reportado Gan et al. (2005).

Al igual que en el tamaño, se observó una reducción en el potencial Z de las Nps tras realizar la encapsulación de los compuestos polifenólicos, cuyo rango se encontró entre 6.27 a -9.30 mV. Este comportamiento se atribuye a la aportación de densidad de carga negativa del extracto polifenólico (-15.40 mV), que logró neutralizar la densidad de carga positiva de los grupos aminos protonados de las nanopartículas del quitosano (Zhang & Zhao 2015). En lo que respecta a las formulaciones se pudo observar un incremento en la variable de estudio asociado al aumento de la concentración de quitosano, que puede deberse a la mayor contribución de grupos aminos disponibles (Woranuch & Yoksan 2013a).

Los resultados del IPD indicaron un incremento en la respuesta tras el proceso de encapsulación. El análisis de varianza sugiere que este incremento puede estar asociado con un aumento del pH y de la relación Q-TPP. De acuerdo a Callaghan & Kerry (2016), un IPD igual a 1, expresa que la muestra tiene una distribución muy amplia y variable de tamaño. Lo anterior sugiere que la formulación Cap-C fue la más homogénea, debido a su menor IPD reportado.

8.5.6. Evaluación de la actividad antioxidante de los encapsulados

En esta etapa se realizó la evaluación de la actividad antioxidante de los compuestos de manera individual (controles: extracto polifenólico, quitosano y Nps de quitosano), contrastando los resultados con los valores obtenidos para el extracto encapsulado, y el extracto después de ser liberado en una solución de CaCl₂ al 1% (tabla 20).

En este estudio no se observó actividad antioxidante para el quitosano, contrario a los resultados al encontrarse en forma de nanopartículas lo que puede atribuirse a que durante la gelificación iónica, los enlaces de hidrógeno intra-moleculares del quitosano quedan expuestos, resultando en una mayor capacidad de donación de hidrógeno (Lee et al. 2014).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Tabla 20. Actividad antioxidante de los controles, de los compuestos polifenólicos encapsulados y liberados, determinada mediante el ensayo de ABTS. Expresada como mg eq. Trolox.

	Formulación	mg eq. Trolox
Controles	Polifenol	586.33 ± 15.01^b
	Quitosano	No detectada
	Nps de quitosano	41.57 ± 4.95^a
Cápsulas	Cap-A	615.38 ± 19.29^c
	Cap-B	468.24 ± 10.91^a
	Cap-C	583.00 ± 23.39^b
	Cap-D	582.52 ± 10.14^b
Extracto liberado	Lib-A	600.62 ± 29.74^c
	Lib-B	566.33 ± 18.09^{bc}
	Lib-C	537.76 ± 9.72^b
	Lib-B	337.29 ± 15.05^a

Valores en la misma fila con diferentes letras indican que son significativamente diferentes ($p < 0.05$). Los datos son valores promedio \pm SD (n=3).

Los resultados demostraron un incremento en la actividad antioxidante de los compuestos polifenólicos encapsulados con respecto a las Nps de quitosano. Resultados similares fueron reportados por (Lee et al. 2014), quienes observaron una mejora en la actividad antioxidante del quitosano tras conjugarlo con diferentes ácidos hidroxinámicos (cafeico, ferúlico y sinápico).

La actividad antioxidante del extracto polifenólico (586.33 ± 15.01 mg eq Trolox) fue comparable con la actividad de las formulaciones, indicando que la actividad del extracto se mantiene cuando se encuentra encapsulado y después de ser liberado. Estos resultados concuerdan con el estudio reportado por Nallamuthu et al. (2015), quienes reportaron la eficiencia de las Nps de quitosano para mantener la actividad antioxidante del ácido clorogénico. Al analizar los resultados de la formulación Cap-A (615.38 ± 19.29 mg eq Trolox), se observó un incremento en la actividad con respecto al polifenol libre, por lo que se eligió a esta formulación como la mejor de las 4 formulaciones evaluadas.

8.5.6. Evaluación de la actividad antibacteriana de los encapsulados

Al igual que en la actividad antioxidante, se realizó la evaluación de la actividad antibacteriana de los compuestos de manera individual (controles), del extracto encapsulado y del extracto después de ser liberado en una solución de CaCl₂ al 1% (tabla 21).

Tabla 21. Resultados de CMI de los controles, de los compuestos polifenólicos encapsulados y liberados. Determinados por el método de dilución en placa de 96 pozos

Formulación	Microorganismo			
	<i>Escherichia coli</i> (µg/mL)	<i>Salmonella typhimurium</i> (µg/mL)	<i>Staphylococcus aureus</i> (µg/mL)	
Controles	Polifenol	11.40 ± 0	11.40 ± 0	11.40 ± 0
	Quitosano	13.33 ± 0	26.67 ± 0	20.00 ± 0
	Nps de quitosano	30.00 ± 0	40.00 ± 0	30.00 ± 0
Cápsula	Cap-A	5.31 ± 0	5.90 ± 0	4.72 ± 0
	Cap-B	6.02 ± 0	9.03 ± 0	6.02 ± 0
	Cap-C	9.45 ± 0	9.45 ± 0	9.45 ± 0
	Cap-D	9.41 ± 0	9.41 ± 0	9.41 ± 0
Extracto liberado	Lib-A	5.2 ± 0	5.2 ± 0	5.2 ± 0
	Lib-B	5.1 ± 0	5.1 ± 0	5.1 ± 0
	Lib-C	15.05 ± 0	15.05 ± 0	15.05 ± 0
	Lib-B	10.35 ± 0	7.75 ± 0	7.75 ± 0

Los datos son valores promedio (n=2).

La actividad antibacteriana del extracto polifenólico de limón persa ha sido asociada a la presencia de compuestos flavonoides (Nakajima et al. 2014; Ae et al. 2013), los cuales pueden ocasionar daños a la membrana citoplasmática, o bien a través de la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos y del metabolismo energético (Cushnie & Lamb 2011).

Por su parte, la actividad antibacteriana del quitosano observada frente a bacterias Gram-positivas puede atribuirse a la interacción electrostática del quitosano con los ácidos teicoicos incorporados en la capa de peptidoglicano, lo que interrumpe su funcionamiento, conduciendo a alteraciones del funcionamiento celular. Mientras que la actividad frente a bacterias Gram-negativas ha sido atribuida al efecto de quelación del quitosano con diferentes cationes (Ca^{+2} , Mg^{+2} , etc.), al igual que a la interacción electrostática del quitosano con las partes aniónicas del lipopolisacárido en la membrana externa (Verlee et al. 2017).

Los resultados de la tabla 21 indicaron una reducción en la CMI de las formulaciones con respecto al extracto polifenólico sin encapsular. Esta mejora en la actividad antibacteriana puede sugerir un efecto sinérgico entre el polifenol y las Nps de quitosano, producto de interacciones inter e intra-moleculares de ambos compuestos (Iturriaga et al. 2014). Resultados similares fueron obtenidos por Lee et al. (2014) quienes demostraron que la conjugación de ácidos hidroxinámicos con quitosano dio lugar a una mejora de la actividad antimicrobiana con respecto a los quitosanos libres, exhibiendo actividad frente a *Bacillus subtilis* (CMI: 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), *Enterococcus faecalis* (CMI: 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y *Listeria monocytogenes* (CMI: 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Los resultados de CMI frente a las tres cepas evaluadas presentaron la siguiente tendencia (en orden de menor a mayor CMI): $A < B < D < C$. Al igual que en la actividad antioxidante, la formulación A presentó nuevamente el mayor potencial antibacteriano. Lo anterior indica que las condiciones de formación de las Nps de quitosano (pH, concentración y su relación con el agente entrecruzante) presentaron efecto sobre la actividad antibacteriana, cuyo potencial biológico podría ser explotado particularmente en el área de la industria alimentaria.

9. CONCLUSIONES

Los subproductos de limón persa (*Citrus latifolia*) demostraron ser una fuente potencial de polifenoles, principalmente de hesperidina y eriocitrina, cuyo porcentaje con respecto al contenido total de polifenoles fue de 49.33% y de 36.47%, el cual se correlacionó con la actividad antioxidante y antibacteriana del extracto.

El estudio realizado proporcionó evidencia de que la EAU resultó ser una tecnología apropiada para la obtención de compuestos polifenólicos. De acuerdo a los resultados de la metodología de superficie de respuesta los factores que presentaron efecto significativo ($p < 0.05$) sobre el rendimiento de extracción de polifenoles asistido por ultrasonido fueron la concentración de etanol (X1), amplitud de radiación (X2), tiempo de sonicación (X3) y relación soluto-solvente (X4). Las condiciones óptimas determinadas fueron: X1: 50%, X2: 10 min, X3: 90.59% y X4: 1/50 g/mL, cuyo valor máximo estimado para el rendimiento de extracción fue igual a 17.14 mg EAG/g bs, superando el rendimiento obtenido por el método convencional (10.5 mg EAG/g bs).

La desacetilación de quitina asistida por ultrasonido permitió la producción de diferentes quitosanos, cuyos porcentajes de solubilidad (13.42 al 100%) dependieron fuertemente de los parámetros del proceso, principalmente por la concentración de NaOH y amplitud de irradiación ($p < 0.05$). De acuerdo a los resultados, la condición que permitió alcanzar una solubilidad total del quitosano (100%), fue al emplear una concentración de hidróxido de sodio del 65%, amplitud del 90 % y un intervalo de sonicación de 5-5 min (5 en sonicación-5 en agitación magnética).

La tecnología de gelificación iónica a partir de la interacción electroestática entre el quitosano obtenido por ultrasonido con TPP permitió la formación de partículas del tamaño en orden de nanómetros (91.1 ± 1.64 a 251.1 ± 10.68 nm) con densidad de carga positiva (16.1 ± 2.11 , a 37.9 ± 2.75 mV) e IPD aceptable (0.152 ± 0 a 0.454 ± 0.1). Estas características presentaron una fuerte dependencia a las variables involucradas en el proceso de formación, incluyendo el pH, concentración y relación de quitosano con el agente entrecruzante, el tiempo de agitación y la implementación del ultrasonido.

CONCLUSIONES

Las condiciones de formación de las nanopartículas de quitosano causaron efectos significativos sobre la eficiencia de encapsulación de los polifenoles del extracto de limón persa, cuya eficiencia osciló entre el intervalo del 47.48 ± 0.34 al 53.50 ± 0.25 %. La interacción entre el quitosano, el TPP y los compuestos polifenólicos, fueron evidenciadas a partir de los resultados obtenidos por las técnicas de espectroscopia de infrarrojo, difracción de rayos-X, calorimetría diferencial de barrido y microscopia electrónica de barrido, mediante los cambios observados en las variables de respuesta de cada técnica.

Por otra parte, los resultados de la evaluación de la actividad antioxidante, indicaron que la actividad del extracto se mantuvo durante la encapsulación (615.38 ± 19.29 mg eq. Trolox) y posterior liberación (600.62 ± 29.74 mg eq. Trolox). Así mismo, se observó una mejora en actividad antibacteriana de hasta un 60 % en comparación con el extracto libre. Lo anterior sugiere un efecto sinérgico entre los compuestos presentes en el sistema de encapsulación, cuyo potencial biológico podría ser explotado particularmente en el área de la industria alimentaria.

10. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, pueden dar lugar a futuras investigaciones, dirigidas a la obtención de quitosano asistida por ultrasonido, bajo el enfoque de la búsqueda de nuevas alternativas para sustituir el uso de reactivos alcalinos, como pudiera ser, la combinación del ultrasonido con un método biológico, que permita además, minimizar los tiempos del proceso.

De igual manera, se propone como futuro objeto de interés, estudiar la cinética de liberación de los compuestos polifenólicos en función al tiempo y actividad biológica, evaluando su comportamiento en un simulador de tracto digestor.

Las características fisicoquímicas, en conjunto con la actividad antioxidante y antibacteriana de los compuestos obtenidos, lo hacen un excelente candidato para ser utilizado en la industria alimentaria, como agente de conservación. Por lo anterior, consideramos que sería interesante aplicar los compuestos desarrollados en matrices alimentarias, evaluando el efecto de la adición del encapsulado sobre las propiedades fisicoquímicas y sensoriales del alimento, monitoreando la vida de anaquel del producto.

11. REFERENCIAS

- Abdel-rahman, R.M., Hrdina, R. & Abdel-mohsen, A.M., 2015. International Journal of Biological Macromolecules Chitin and chitosan from Brazilian Atlantic Coast : Isolation , characterization and antibacterial activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 80, pp.107–120. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.06.027>.
- Ae, E. et al., 2013. Flavonoid profile and biological activity of Korean citrus varieties (II): Pyunkyul (Citrus tangerina Hort . ex Tanaka) and overall contribution of its flavonoids to antioxidant effect. *Journal of Functional Foods*, 6, pp.637–642. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2013.12.007>.
- Agócs, A. et al., 2007. Comparative study on the carotenoid composition of the peel and the pulp of different citrus species. , 8, pp.390–394.
- Ajun, W. et al., 2009. Preparation of aspirin and probucol in combination loaded chitosan nanoparticles and in vitro release study. *Carbohydrate Polymers*, 75(4), pp.566–574. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.08.019>.
- Al-dhabi, N.A., Ponnurugan, K. & Maran, P., 2017. Ultrasonics Sonochemistry Development and validation of ultrasound-assisted solid-liquid extraction of phenolic compounds from waste spent coffee grounds. *Ultrasonics - Sonochemistry*, 34, pp.206–213. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.05.005>.
- Alexandru, L. et al., 2013. Ultrasound-assisted extraction of clove buds using batch- and flow-reactors : A comparative study on a pilot scale. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 20, pp.167–172. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2013.07.011>.
- Anbinder, P.S. et al., 2011. Yerba Mate Extract Encapsulation with Alginate and Chitosan Systems : Interactions between Active Compound Encapsulation Polymers. , 2011(December), pp.80–87.
- Anon, 2015. Citrus : World Markets and Trade.
- Anon, 2003. Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solutions. , (September).
- Armenta, S., Garrigues, S. & Guardia, M. De, 2015. Trends in Analytical Chemistry. , 71, pp.2–8.
- Awad, T.S. et al., 2012. Applications of ultrasound in analysis , processing and quality control of food : A review. *FRIN*, 48(2), pp.410–427. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.05.004>.
- Aybastier, Ö., Is, E. & Saliha, S., 2013. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant compounds from blackberry leaves using response surface methodology. , 44, pp.558–565.
- Bajaj, M., Winter, J. & Gallert, C., 2011. Effect of deproteination and deacetylation conditions on viscosity of

REFERENCIAS

- chitin and chitosan extracted from Crangon crangon shrimp waste. , 56, pp.51–62.
- Balasundram, N., 2006. Food Chemistry Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products : Antioxidant activity , occurrence , and potential uses. , 99, pp.191–203.
- Barba, F.J. et al., 2016. Trends in Food Science & Technology Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products : A review. *Trends in Food Science & Technology*, 49, pp.96–109. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2016.01.006>.
- Barreca, D. et al., 2011. Flavonoid profile and radical-scavenging activity of Mediterranean sweet lemon (Citrus limetta Risso) juice. *Food Chemistry*, 129(2), pp.417–422. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.093>.
- Beckers, H. et al., 2013. Low-Water Activity Foods : Increased Concern as Vehicles of Foodborne Pathogens Low – Water Activity Foods : Increased Concern as Vehicles of Foodborne Pathogens. , (May 2016).
- Belgacem, M.N. & Gandini, A., 2008. *Monomers , Polymers and Composites*,
- Bendicho, C. et al., 2012. Ultrasound-assisted pretreatment of solid samples in the context of green analytical chemistry. , 31.
- Benhabiles, M.S. et al., 2012. Food Hydrocolloids Antibacterial activity of chitin , chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste. *Food hydrocolloids*, 29(1), pp.48–56. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.02.013>.
- Biesaga, M., 2011. Influence of extraction methods on stability of flavonoids. , 1218, pp.2505–2512.
- Birolli, W.G. et al., 2016. Ultrasound-assisted conversion of alpha-chitin into chitosan. *Applied Acoustics*, 103, pp.239–242. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apacoust.2015.10.002>.
- Brito, A. et al., 2014. HPLC-UV-MS Profiles of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Fruits from Three Citrus Species Consumed in Northern Chile. , pp.17400–17421.
- Cai, Z. et al., 2016. of anthocyanins from purple sweet potatoes. , 197, pp.266–272.
- Callaghan, K.A.M.O. & Kerry, J.P., 2016. Preparation of low- and medium-molecular weight chitosan nanoparticles and their antimicrobial evaluation against a panel of microorganisms , including cheese-derived cultures. , 69, pp.256–261.
- Cao, W. et al., 2015. Quantitative analysis of flavanones from citrus fruits by using mesoporous molecular sieve-based miniaturized solid phase extraction coupled to ultrahigh-performance liquid chromatography and quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1406, pp.68–77. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.06.035>.
- Cardoso, B., 2011. Ultrasound-assisted deacetylation of beta-chitin : influence of processing parameters P

REFERENCIAS

- Campana-Filho, (July 2010), pp.903–909.
- Carrera, C. et al., 2012. Analytica Chimica Acta Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. *Analytica Chimica Acta*, 732, pp.100–104. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2011.11.032>.
- Casagrande, C. et al., 2015. Scalable production of highly concentrated chitosan / TPP nanoparticles in different pHs and evaluation of the in vitro transfection efficiency. , 94, pp.65–73.
- Casquete, R. et al., 2015. Evaluation of the effect of high pressure on total phenolic content , antioxidant and antimicrobial activity of citrus peels. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2015.07.005>.
- Chemat, F. et al., 2017. Ultrasonics Sonochemistry Ultrasound assisted extraction of food and natural products . Mechanisms , techniques , combinations , protocols and applications . A review. , 34, pp.540–560.
- Chemat, F. & Khan, M.K., 2011. Ultrasonics Sonochemistry Applications of ultrasound in food technology : Processing , preservation and extraction. *Ultrasonics - Sonochemistry*, 18(4), pp.813–835. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.11.023>.
- Chen, M., Zhao, Y. & Yu, S., 2015. Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds , antioxidants , and anthocyanins from sugar beet molasses. *FOOD CHEMISTRY*, 172, pp.543–550. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.110>.
- Chinapongtitiwat, V., Jongaroontaprangsee, S. & Chiewchan, N., 2013. Important flavonoids and limonin in selected Thai citrus residues. *Journal of Functional Foods*, 5(3), pp.1151–1158. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2013.03.012>.
- Corbin, C. et al., 2015. Ultrasonics Sonochemistry Development and validation of an efficient ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from flax (*Linum usitatissimum* L .) seeds. *Ultrasonics - Sonochemistry*, 26, pp.176–185. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.02.008>.
- Cushnie, T.P.T. & Lamb, A.J., 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. , 26, pp.343–356.
- Cushnie, T.P.T. & Lamb, A.J., 2011. International Journal of Antimicrobial Agents Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. , 38, pp.99–107.
- Dahmoune, F. et al., 2013. Valorization of Citrus limon residues for the recovery of antioxidants : Evaluation and optimization of microwave and ultrasound application to solvent extraction. *Industrial Crops & Products*, 50, pp.77–87. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.013>.
- Delmar, K. & Bianco-peled, H., 2015. The dramatic effect of small pH changes on the properties of chitosan hydrogels crosslinked with genipin. *Carbohydrate Polymers*, 127, pp.28–37. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.03.039>.

REFERENCIAS

- Desbrie, J. et al., 2001. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. , 42.
- Dhawade, P.P. & Jagtap, R.N., 2012. Characterization of the glass transition temperature of chitosan and its oligomers by temperature modulated differential scanning calorimetry. , 3(3), pp.1372–1382.
- Domard, A., 2011. A perspective on 30 years research on chitin and chitosan. , 84, pp.696–703.
- Dong, Y. et al., 2004. Studies on Glass Transition Temperature of Chitosan with Four Techniques. , 5.
- Drosou, C. et al., 2015. A comparative study on different extraction techniques to recover red grape pomace polyphenols from vinification byproducts. *Industrial Crops & Products*, 75, pp.141–149. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.063>.
- Dudhani, A.R. & Kosaraju, S.L., 2010. Bioadhesive chitosan nanoparticles : Preparation and characterization. *Carbohydrate Polymers*, 81(2), pp.243–251. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.02.026>.
- Dutra, A. et al., 2016. Ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of phenolic compounds from *Phyllanthus amarus* and its composition evaluation by UPLC-QTOF. , 79, pp.91–103.
- Dzul, L., 2014. *OBTENCIÓN DE EXTRACTOS POLIFENÓLICOS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA A PARTIR DE HARINAS ELABORADAS CON SUBPRODUCTOS DE LIMÓN ITALIANO*.
- Fakhreddin, S. et al., 2013. Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles : Preparation , characterization and in vitro release study. *Carbohydrate Polymers*, 95(1), pp.50–56. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.031>.
- Faridi, A. & Mahdi, S., 2016. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Biopolymer nano-particles and natural nano-carriers for nano-encapsulation of phenolic compounds. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 146, pp.532–543. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.06.053>.
- Fiamingo, A. et al., 2016. Ultrasonics Sonochemistry Extensively deacetylated high molecular weight chitosan from the multistep ultrasound-assisted deacetylation of beta-chitin. *ULTRASONICS SONOCHEMISTRY*, 32, pp.79–85. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.02.021>.
- Floris, A. et al., 2013. Cavitation effect on chitosan nanoparticle size : A possible approach to protect drugs from ultrasonic stress. , 94, pp.619–625.
- Galvan D'Alessandro, L. et al., 2012. Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. *Separation and Purification Technology*, 93, pp.42–47. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2012.03.024>.
- Gan, Q. et al., 2005. Modulation of surface charge , particle size and morphological properties of chitosan – TPP nanoparticles intended for gene delivery. , 44, pp.65–73.
- Garcia-castello, E.M. et al., 2015. LWT - Food Science and Technology Optimization of conventional and

REFERENCIAS

- ultrasound assisted extraction of flavonoids from grapefruit (*Citrus paradisi* L .) solid wastes. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), pp.1114–1122. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.024>.
- Ghorbel-bellaaj, O. et al., 2012. International Journal of Biological Macromolecules Chitin extraction from shrimp shell waste using *Bacillus* bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51(5), pp.1196–1201. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.08.034>.
- Gierszewska, M. & Ostrowska-czubenko, J., 2016. Chitosan-based membranes with different ionic crosslinking density for pharmaceutical and industrial applications. , 153, pp.501–511.
- Gierszewska-Drużyńska, 2010. THE EFFECT OF IONIC CROSSLINKING ON THERMAL PROPERTIES OF HYDROGEL CHITOSAN MEMBRANES Magdalena Gierszewska-Drużyńska , Jadwiga Ostrowska-Czubenko. , XV, pp.25–32.
- Gopalakrishnan, L. et al., 2014. Ellagic acid encapsulated chitosan nanoparticles as anti-hemorrhagic agent. *Carbohydrate Polymers*, 111, pp.215–221. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.03.093>.
- Goula, A.M., Thymiatis, K. & Kaderides, K., 2016. Food and Bioproducts Processing Valorization of grape pomace : Drying behavior and ultrasound extraction of phenolics. , 0, pp.132–144.
- Hamed, I., Ozogul, F. & Regenstein, J.M., 2016. Trends in Food Science & Technology Industrial applications of crustacean by-products (chitin , chitosan , and chitooligosaccharides): A review. , 48, pp.40–50.
- Harris, R. et al., 2011. Chitosan nanoparticles and microspheres for the encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. , 84, pp.803–806.
- Helal, A. et al., 2015. LWT - Food Science and Technology Gastro-pancreatic release of phenolic compounds incorporated in a polyphenols-enriched cheese-curd. , 60.
- Hirai, A., Odani, H. & Nakajima, A., 1991. Bullelill Determination of degree of deacetylation of chitosan by ¹H NMR spectroscopy. , 94, pp.87–88.
- Hossain, M.B. et al., 2012. Ultrasonics Sonochemistry Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (*Origanum majorana* L .) using response surface methodology. *Ultrasonics - Sonochemistry*, 19(3), pp.582–590. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.11.001>.
- Hosseinnejad, M. & Mahdi, S., 2016. International Journal of Biological Macromolecules Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 85, pp.467–475. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.022>.
- Hu, B. et al., 2016. ScienceDirect Food macromolecule based nanodelivery systems for enhancing the bioavailability of polyphenols. , 5, pp.3–15.

REFERENCIAS

- Huang, Y. & Ho, S., 2010. Polymethoxy flavones are responsible for the anti-inflammatory activity of citrus fruit peel. *Food Chemistry*, 119(3), pp.868–873. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.092>.
- Ignat, I., Volf, I. & Popa, V.I., 2011. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. , 126, pp.1821–1835.
- Inssen, J.O.P.H.L., Eldhuizen, A.L.V.A.N. V & Root, Æ.D.E.D.E.G., 2002. Identification of Radical Scavengers in Sweet Grass (*Hierochloe odorata*). , pp.2914–2919.
- Iturriaga, L. et al., 2014. Active naringin-chitosan films : Impact of UV irradiation. *Carbohydrate Polymers*, 110, pp.374–381. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.03.062>.
- Jiang, X. et al., 2012. The plasticizing mechanism and effect of calcium chloride on starch / poly (vinyl alcohol) films. *Carbohydrate Polymers*, 90(4), pp.1677–1684. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.07.050>.
- Kadam, S.U. et al., 2015. Trends in Food Science & Technology Ultrasound applications for the extraction , identi fi cation and delivery of food proteins and bioactive peptides b. , 46, pp.60–67.
- Kamran, M. & Dangles, O., 2014. Journal of Food Composition and Analysis A comprehensive review on flavanones , the major citrus polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 33(1), pp.85–104. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2013.11.004>.
- Khan, M.K. et al., 2010. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L .) peel. *Food Chemistry*, 119(2), pp.851–858. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.046>.
- Khan, T.A. et al., 2002. Reporting degree of deacetylation values of chitosan : the influence of analytical methods. , 5(3), pp.205–212.
- Konecni, K., Low, N.H. & Nickerson, M.T., 2012. Chitosan – tripolyphosphate submicron particles as the carrier of entrapped rutin. *Food Chemistry*, 134(4), pp.1775–1779. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.070>.
- Kouchak, M., 2015. Preparation and In Vitro Evaluation of Chitosan Nanoparticles Containing Diclofenac Using the Ion-Gelation Method. , 10(2).
- Kumar, M.N.V.R., 2000. A review of chitin and chitosan applications q. , 46, pp.1–27.
- Kumar, S.P. et al., 2015. International Journal of Biological Macromolecules Antioxidant studies of chitosan nanoparticles containing naringenin and their cytotoxicity effects in lung cancer cells. , 78, pp.87–95.
- Kumari, S. et al., 2015. Environmental Technology & Innovation Extraction and characterization of chitin and

REFERENCIAS

- chitosan from fishery waste by chemical method. *Environmental Technology & Innovation*, 3, pp.77–85. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eti.2015.01.002>.
- Kurita, K., 2001. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. , 26.
- Lamarra, J., Rivero, S. & Pinotti, A., 2016. Design of chitosan-based nanoparticles functionalized with gallic acid. *Materials Science & Engineering C*, 67, pp.717–726. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.05.072>.
- Lange, A. et al., 2014. Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects Factorial design as tool in chitosan nanoparticles development by ionic gelation technique. , 445, pp.34–39.
- Ledesma-escobar, C.A., Luque, D. & Castro, D., 2014. Towards a comprehensive exploitation of citrus. , 39.
- Ledesma-escobar, C.A. & Priego-capote, F., 2015. Talanta Comparative study of the effect of auxiliary energies on the extraction of Citrus fruit components. , 144, pp.522–528.
- Lee, D. et al., 2014. Chitosan – hydroxycinnamic acid conjugates : Preparation , antioxidant and antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 148, pp.97–104. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.019>.
- Leharne, S.A., Omari, M.M. Al & Badwan, A.A., 2011. *chapter 2 -Chitin* 1st ed., Elsevier Inc. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-387667-6.00002-6>.
- Li, J. & Huang, Q., 2012. Rheological properties of chitosan – tripolyphosphate complexes : From suspensions to microgels. , 87, pp.1670–1677.
- Li, Z. et al., 2015. Food Hydrocolloids A review : Using nanoparticles to enhance absorption and bioavailability of phenolic phytochemicals. *Food hydrocolloids*, 43, pp.153–164. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.05.010>.
- Limem, K., Majdoub, H. & Rouatbi, S., 2016. Antioxidant and antimicrobial proprieties of chitin and chitosan extracted from Parapenaeus Longirostris shrimp shell waste. *Annales Pharmaceutiques Francaises*, 74(1), pp.27–33. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharma.2015.07.005>.
- López-león, T. et al., 2005. Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles : electrokinetic and stability behavior. , 283, pp.344–351.
- Luo, Y. & Wang, Q., 2013. Recent Advances of Chitosan and Its Derivatives for Novel Applications in Food Science Beverages. , 1(1).
- M'hiri, N. et al., 2015. Food and Bioproducts Processing Effect of different operating conditions on the extraction of phenolic compounds in orange peel. , 6, pp.161–170.
- Madureira, A.R., Pereira, A. & Pintado, M., 2016. Chitosan nanoparticles loaded with 2 , 5-dihydroxybenzoic acid and protocatechuic acid : Properties and digestion. , 174, pp.8–14.

REFERENCIAS

- Madureira, A.R., Pereira, A. & Pintado, M., 2015. Current state on the development of nanoparticles for use against bacterial gastrointestinal pathogens . Focus on chitosan nanoparticles loaded with phenolic compounds. , 130, pp.429–439.
- Mane, S. et al., 2015. Ultrasonics Sonochemistry Effect of ultrasound on the extraction of total anthocyanins from Purple Majesty potato. , 27, pp.509–514.
- Marcela, D. et al., 2013. quitina y quitosano desde caparazones de. , 18(1), pp.260–266.
- Medina-torres, N., Ayora-talavera, T. & Espinosa-andrews, H., 2017. Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources.
- Meullemiestre, A. et al., 2016. Ultrasonics Sonochemistry Impact of ultrasound on solid – liquid extraction of phenolic compounds from maritime pine sawdust waste . Kinetics , optimization and large scale experiments. *Ultrasonics - Sonochemistry*, 28, pp.230–239. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.07.022>.
- Mohammadi, A., Hashemi, M. & Masoud, S., 2016. LWT - Food Science and Technology Effect of chitosan molecular weight as micro and nanoparticles on antibacterial activity against some soft rot pathogenic bacteria. , 71, pp.347–355.
- Moreno, D.A., 2010. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Natural bioactive compounds of Citrus limon for food and health. , 51, pp.327–345.
- Muñiz-márquez, D.B. et al., 2013. Ultrasonics Sonochemistry Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Laurus nobilis* L . and their antioxidant activity. , 20, pp.1149–1154.
- Musielak, G., Mierzwa, D. & Kroehnke, J., 2016. Trends in Food Science & Technology Food drying enhancement by ultrasound e A review. *Trends in Food Science & Technology*, 56, pp.126–141. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2016.08.003>.
- Nakajima, V.M., Macedo, G.A. & Macedo, J.A., 2014. LWT - Food Science and Technology Citrus bioactive phenolics : Role in the obesity treatment. , 59.
- Nallamuthu, I., Devi, A. & Khanum, F., 2015. ScienceDirect Chlorogenic acid loaded chitosan nanoparticles with sustained release property , retained antioxidant activity and enhanced bioavailability. , 0, pp.3–11.
- Nayak, B. et al., 2015. Comparison of microwave , ultrasound and accelerated-assisted solvent extraction for recovery of polyphenols from Citrus sinensis peels. *FOOD CHEMISTRY*, 187, pp.507–516. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.081>.
- Ngo, D. et al., 2015. Food Hydrocolloids Biological effects of chitosan and its derivatives. *Food hydrocolloids*, 51, pp.200–216. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.05.023>.

REFERENCIAS

- Nidheesh, T., Pal, G.K. & Suresh, P. V, 2015. Chitooligomers preparation by chitosanase produced under solid state fermentation using shrimp by-products as substrate. *Carbohydrate Polymers*, 121, pp.1–9. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.12.017>.
- NMX-F-317-S-1978, 1978. DETERMINACIÓN DE pH EN ALIMENTOS. , pp.4–6.
- NMX-F-428-1982, 1982. ALIMENTOS. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD (MÉTODO RÁPIDO DE LA TERMOBALANZA). , pp.5–6.
- Otang, W.M. & Afolayan, A.J., 2016. South African Journal of Botany Antimicrobial and antioxidant efficacy of Citrus limon L . peel extracts used for skin diseases by Xhosa tribe of Amathole District , Eastern Cape , South Africa. , 102, pp.46–49.
- Pacheco, N., Larralde-corona, C.P. & Sepulveda, J., 2008. as growth inhibitors of *Penicillium digitatum*. , 43, pp.20–26.
- Pan, Z. et al., 2012. Continuous and pulsed ultrasound-assisted extractions of antioxidants from pomegranate peel. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(2), pp.365–372. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.05.015>.
- Panwar, R. et al., 2016. Microbial Pathogenesis Efficacy of ferulic acid encapsulated chitosan nanoparticles against *Candida albicans* bio film. , 95, pp.21–31.
- Parisi, O.I. et al., 2014. *Polyphenols and Their Formulations : Different Strategies to Overcome the Drawbacks Associated with Their Poor Stability and Bioavailability*, Elsevier Inc. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-398456-2.00004-9>.
- Parize, A.L. et al., 2012. Artigo. , 35(6), pp.1127–1132.
- Paul, E. & Grijalva, G., 2016. Bioavailability of dietary phenolic compounds : Revista Española de Nutrición Humana y Dietética. , (August).
- Peterson, J.J. et al., 2006. ARTICLE IN PRESS Flavanones in grapefruit , lemons , and limes : A compilation and review of the data from the analytical literature. , 19, pp.74–80.
- Pico, Y., 2013. Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples. , 43.
- Pillai, C.K.S., Paul, W. & Sharma, C.P., 2009. Progress in Polymer Science Chitin and chitosan polymers : Chemistry , solubility and fiber formation. , 34, pp.641–678.
- Pingret, D. et al., 2012. Lab and pilot-scale ultrasound-assisted water extraction of polyphenols from apple pomace. *Journal of Food Engineering*, 111(1), pp.73–81. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.01.026>.
- Popa, M. et al., 2000. Study of the interactions between polyphenolic compounds and chitosan. , 45, pp.35–43.

REFERENCIAS

- Porras, I., Ortun, A. & Garcí, A., 2004. Citrus limon : a source of flavonoids of pharmaceutical interest. , 84, pp.457–461.
- Porto, C. Da, Porretto, E. & Decorti, D., 2013. Ultrasonics Sonochemistry Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. , 20, pp.1076–1080.
- Prashanth, K.V.H. & Tharanathan, R.N., 2007. Chitin / chitosan : modifications and their unlimited application potential d an overview. , 18.
- Pulicharla, R. et al., 2016. International Journal of Biological Macromolecules Encapsulation and release studies of strawberry polyphenols in biodegradable chitosan nanoformulation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 88, pp.171–178. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.03.036>.
- Qi, L. et al., 2004. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. , 339, pp.2693–2700.
- Qin, Y. et al., 2010. Chitosan green tea polyphenol complex as a released control compound for wound healing. *Chinese Journal of Traumatology English Edition*, 13(2), pp.91–95. Available at: <http://dx.doi.org/10.3760/cma.j.issn.1008-1275.2010.02.006>.
- Rabelo, R.S. et al., 2016. Ultrasound assisted extraction and nano fi ltration of phenolic compounds from artichoke solid wastes. , 178, pp.170–180.
- Ramin, B. et al., 2016. Food Hydrocolloids Preparation and optimization of Pickering emulsion stabilized by chitosan-tripolyphosphate nanoparticles for curcumin encapsulation. , 52, pp.369–377.
- Ramos-ponce, L.M. et al., 2010. RESEARCH ARTICLE A Simple Colorimetric Determination of the Free Amino Groups in Water Soluble Chitin Derivatives Using Genipin. , 19(3), pp.683–689.
- Rázga, F. et al., 2016. Preparation of chitosan-TPP sub-micron particles : Critical evaluation and derived recommendations. , 151, pp.488–499.
- Rinaudo, M., 2006. Chitin and chitosan : Properties and applications. , 31, pp.603–632.
- Robles, E. et al., 2016. Self-bonded composite films based on cellulose nanofibers and chitin nanocrystals as antifungal materials. , 144, pp.41–49.
- Rødde, R.H., Einbu, A. & Va, K.M., 2008. A seasonal study of the chemical composition and chitin quality of shrimp shells obtained from northern shrimp (*Pandalus borealis*). , 71, pp.388–393.
- Rodrigues, S. et al., 2015. Ultrasound extraction of phenolics and anthocyanins from jabuticaba peel. *Industrial Crops & Products*, 69, pp.400–407. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.02.059>.
- Rodríguez-Pérez, C. et al., 2015. Optimization of extraction method to obtain a phenolic compounds-rich extract from *Moringa oleifera* Lam leaves. *Industrial Crops and Products*, 66, pp.246–254. Available at:

REFERENCIAS

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.002>.
- Rodríguez-rojo, S. et al., 2012. Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. , 109, pp.98–103.
- Rostagno, M.A., Palma, M. & Barroso, C.G., 2003. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography A*, 1012(2), pp.119–128.
- S. Tripathi, G.K. Mehrotra, P.K.D., 2009. Physicochemical and bioactivity of cross- linked chitosan-PVA film for food packaging applications. , (August).
- Sacco, P. et al., 2016. International Journal of Biological Macromolecules Insight into the ionotropic gelation of chitosan using tripolyphosphate and pyrophosphate as cross-linkers. , 92, pp.476–483.
- Sagheer, F.A. Al et al., 2009. Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. *Carbohydrate Polymers*, 77(2), pp.410–419. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.01.032>.
- Sakurai, K., Maegawa, T. & Takahashi, T., 2000. Glass transition temperature of chitosan and miscibility of chitosan / poly (N -vinyl pyrrolidone) blends. , 41, pp.7051–7056.
- Samar, M.M., Khalaf, M.M. & El-razik, M.M.A., 2013. Physicochemical , functional , antioxidant and antibacterial properties of chitosan extracted from shrimp wastes by microwave technique. *Annals of Agricultural Sciences*, 58(1), pp.33–41. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aoas.2013.01.006>.
- Sarrate, R. et al., 2013. Impact of physical parameters on particle size and reaction yield when using the ionic gelation method to obtain cationic polymeric chitosan – tripolyphosphate nanoparticles. , 446, pp.199–204.
- Selin Sahin, R.S., 2013. Ultrasonics Sonochemistry Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. , 20, pp.595–602.
- Shirsath, S.R., Sonawane, S.H. & Gogate, P.R., 2012. Chemical Engineering and Processing : Process Intensification Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations — A review of current status. , 53, pp.10–23.
- Silva-weiss, A. et al., 2013. Food Hydrocolloids Structural properties of films and rheology of film-forming solutions based on chitosan and chitosan-starch blend enriched with murta leaf extract. *Food hydrocolloids*, 31(2), pp.458–466. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.11.028>.
- Soria, A.C. & Villamiel, M., 2010. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food : a review. , 21.
- Sousa, S. et al., 2016. Purification of polyphenols from green tea leaves by ultrasound assisted ultrafiltration process. , 168, pp.188–198.

REFERENCIAS

- Sunny, M.C., Madras, T. & Scien, M., 1992. Cross - linked Chitosan Microspheres : Preparation and Evaluation as a Matrix for the Controlled Release of Pharmaceuticals Cross-linked Chitosan Microspheres : Preparation and Evaluation as a Matrix for the Controlled Release of Pharmaceuticals. , (March 2016).
- Tao, Y. et al., 2014. Ultrasonics Sonochemistry Ultrasound-assisted extraction of phenolics from wine lees : Modeling , optimization and stability of extracts during storage. , 21, pp.706–715.
- Teli, M.D. & Sheikh, J., 2012. International Journal of Biological Macromolecules Extraction of chitosan from shrimp shells waste and application in antibacterial finishing of bamboo rayon. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50(5), pp.1195–1200. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.04.003>.
- Thi, N., Duong, H. & Dang, N., 2017. International Journal of Biological Macromolecules Effects of low – frequency ultrasound on heterogenous deacetylation of chitin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, pp.1604–1610. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.117>.
- Thi, N., Duong, H. & Nghia, N.D., 2017. Effects of low–frequency ultrasound on heterogenous deacetylation of chitin. *International Journal of Biological Macromolecules*. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.117>.
- Tippens, P.E. & Hernández, A.E.G., 2007. *Física: conceptos y aplicaciones*,
- Tomšik, A. et al., 2016. Ultrasonics Sonochemistry Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from wild garlic (*Allium ursinum* L .). , 29, pp.502–511.
- Tripoli, E. et al., 2007. Food Chemistry Citrus flavonoids : Molecular structure , biological activity and nutritional properties : A review. , 104, pp.466–479.
- Vallejo, F. & Toma, F.A., 2014. Bioavailability and Metabolism of Citrus Fruit Beverage Flavanones in Humans.
- Vázquez, M.F.B. et al., 2014. Ultrasonics Sonochemistry Comparisons between conventional , ultrasound-assisted and microwave-assisted methods for extraction of anthraquinones from *Heterophyllaea pustulata* Hook f. (Rubiaceae). *Ultrasonics - Sonochemistry*, 21(2), pp.478–484. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.08.023>.
- Vazquez-Flota, F., de Lourdes Miranda-Ham, M., Monforte-Gonzalez, M., Gutierrez-Carbajal, G., Velazquez-Garcia, C., & Nieto-Pelayo, Y., 2007. Biosynthesis of capsaicinoids, the pungent principle of peppers. *Rev. Fitotec. Mex.*, 30(4), pp.353–360.
- Verlee, A., Mincke, S. & Stevens, C. V, 2017. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 164, pp.268–283. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.001>.
- Vieira, G.S. et al., 2013. Chemical and economic evaluation of natural antioxidant extracts obtained by

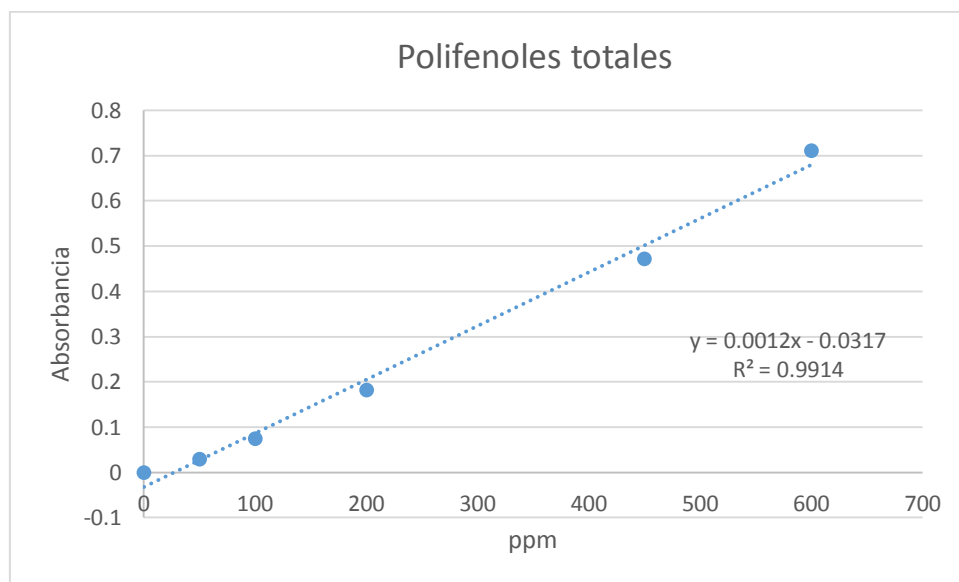
REFERENCIAS

- ultrasound-assisted and agitated bed extraction from jussara pulp (*Euterpe edulis*). , 119, pp.196–204.
- Vilkhu, K. et al., 2008. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry — A review. , 9, pp.161–169.
- Wang, L. et al., 2013. Food Hydrocolloids Preparation and characterization of active films based on chitosan incorporated tea polyphenols. *Food hydrocolloids*, 32(1), pp.35–41. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.11.034>.
- Wang, Y., Chuang, Y. & Hsu, H., 2008. Food Chemistry The flavonoid , carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in Taiwan. , 106, pp.277–284.
- Woranuch, S. & Yoksan, R., 2013a. Eugenol-loaded chitosan nanoparticles : I . Thermal stability improvement of eugenol through encapsulation. , 96, pp.578–585.
- Woranuch, S. & Yoksan, R., 2013b. Eugenol-loaded chitosan nanoparticles : I . Thermal stability improvement of eugenol through encapsulation. *Carbohydrate Polymers*, 96(2), pp.578–585. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.117>.
- Yildiz-ozturk, E. et al., 2015. A comparative study on extraction processes of *Stevia rebaudiana* leaves with emphasis on antioxidant , cytotoxic and nitric oxide inhibition activities. *Industrial Crops & Products*, 77, pp.961–971. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.10.010>.
- Yoo, K. & Moon, B., 2016. Comparative carotenoid compositions during maturation and their antioxidative capacities of three citrus varieties. , 196, pp.544–549.
- Zhang, H. & Zhao, Y., 2015. Preparation , characterization and evaluation of tea polyphenol e Zn complex loaded b -chitosan nanoparticles. *Food hydrocolloids*, 48, pp.260–273. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.02.015>.
- Zhao, P. et al., 2015. Chemical and biological comparison of the fruit extracts of *Citrus wilsonii* Tanaka and *Citrus medica* L . , 173, pp.54–60.
- Zorzi, G.K. et al., 2015. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces A rational approach towards the design of chitosan-based nanoparticles obtained by ionotropic gelation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 135, pp.99–108. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.07.016>.

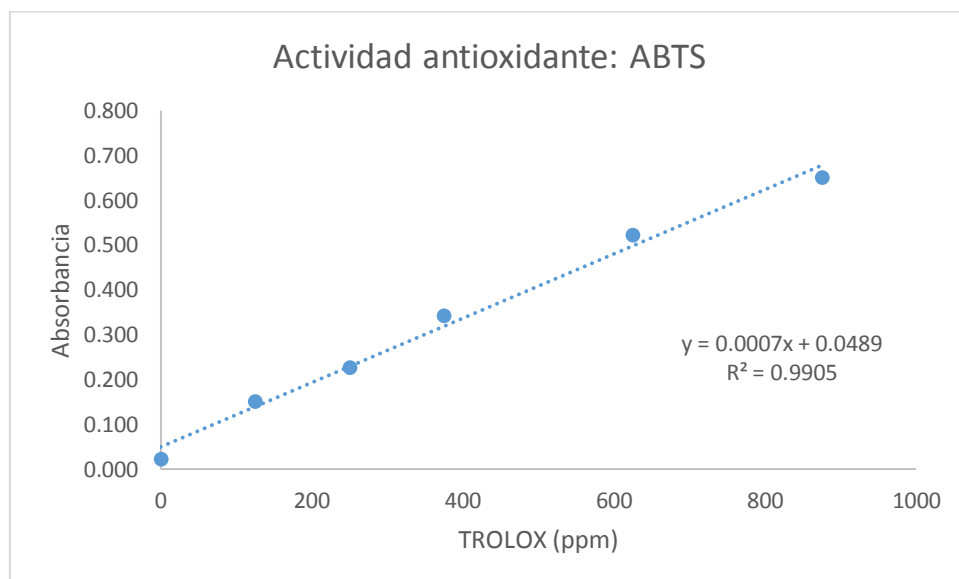
11. ANEXOS

11.1. Curvas de calibración

Anexo 1. Curva de calibración de polifenoles totales para el método espectrofotométrico, expresada como Equivalente Ácido Gálico (EAG)/g base seca (bs).

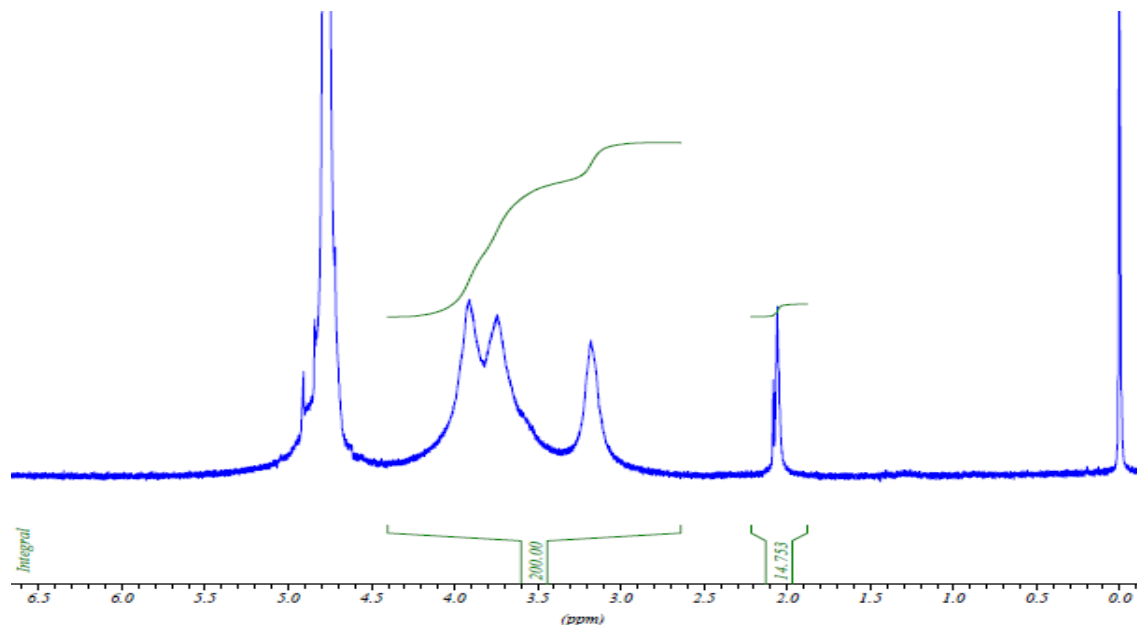


Anexo 2. Curva de calibración de actividad antioxidante para el método espectrofotométrico, expresada como mili Equivalente Trolox.



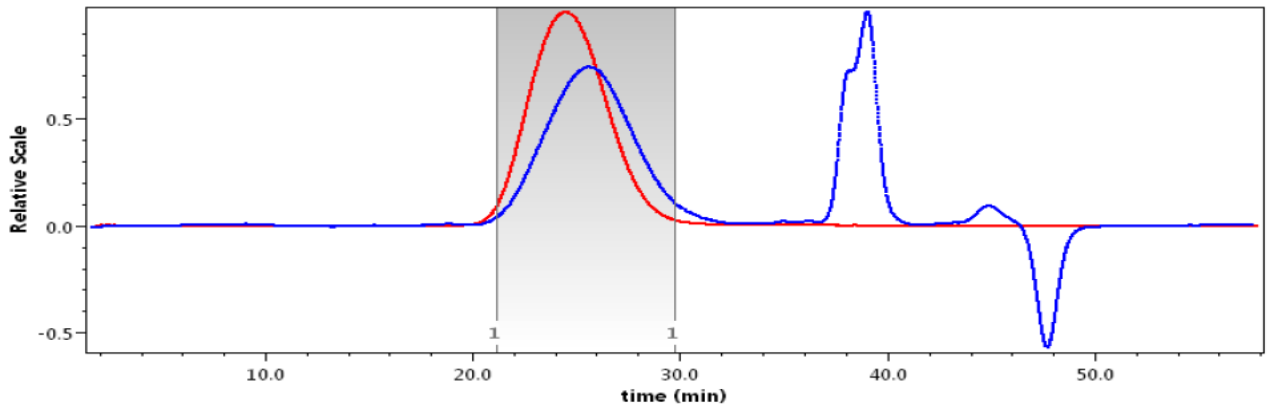
11.2. Gráficos empleados para la caracterización del DA y PM del quitosano

Anexo 3. Espectro de RMN- H^1 correspondiente al QU obtenido a 80 °C a partir de la disolución en HCl/ D₂O 1 %, usando un espectrómetro Bruker AVANCE III (t = 400 MHz).



En el espectro de RMN- H^1 correspondiente al QU puede observarse la presencia de una señal a 2.00 ppm atribuida a los protones del grupo metilo de los residuos de glucosamina acetilados (figura 27). Por su parte las señales entre 3.6 y 4.1 ppm se asocian a los protones de C-3, C-4, C-5 y C-6 del anillo de piranosa, mientras que las señales en 3.1 y 4.8 ppm se atribuyen a los protones C-2 y C-5 de los residuos de glucosamina (Lee et al. 2014) .

Anexo 4. Diagramas de elución SEC del Quitosano obtenido por ultrasonido disuelto en una solución tampón de acetato de amonio 0.15 mol/L y ácido acético 0.20 mol/L (pH = 4.5) adquiridos mediante la inyección de las muestras en columnas TSK2500 y TSK6000.



Anexo 5. Presentaciones en congresos

11.3. Presentación en congresos

Anexo 5. LATIN AMERICAN SYMPOSIUM IN FOOD SAFETY, 2016.



Anexo 6. XXXVIII ENCUENTRO NACIONAL DE LA AMIDIQ, 2017-

The logo for AMIDIQ features the word "AMIDIQ" in a large, orange, serif font. The letters are underlined with a thin orange line. The logo is centered on a background of abstract, overlapping geometric shapes in shades of blue and yellow.

La Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C.
La Ingeniería Química en el Desarrollo Sostenible de Nuevos Procesos y Productos

Otorga el presente

RECONOCIMIENTO

Por la presentación del trabajo:

XXXVIII Encuentro Nacional de la AMIDIQ

Ixtapa Zihuatanejo, Gro., México, del 9 al 12 de mayo de 2017



Dr. Mauricio Sales Cruz
PRESIDENTE DE AMIDIQ



Dr. Jesús Alberto Ochoa Tapia
PRESIDENTE DEL COMITÉ TÉCNICO

**Anexo 7. IV SIMPOSIO INTERNACIONAL AGROALIMENTARIO Y
BIOTECNOLOGICO, 2017**



Villa de San Pablo Huixtepec, Zimatlán, Oaxaca,
28 de agosto de 2017

Estimados Autores,

Medina-Torres Nelly, Espinosa-Andrews Hugo, Ayora-Talavera Teresa¹, Patrón-Vásquez Jesús, Pacheco-López Neith

Nos complace informarles que su trabajo titulado “**NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO CARGADAS CON POLIFENOLES CÍTRICOS Y SU POTENCIAL ANTIBACTERIANO FRENTE A PATÓGENOS ALIMENTARIOS**” ha sido aceptado para su presentación en el IV Simposio Internacional Agroalimentario y Biotecnológico SIAB2017, en la modalidad **ORAL** .

11.4. Artículo de Revisión.

Anexo 8. Review. Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of phenolic Compounds from vegetable sources



agronomy



Review

Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources

Nelly Medina-Torres ¹ , Teresa Ayora-Talavera ¹, Hugo Espinosa-Andrews ², Angeles Sánchez-Contreras ¹  and Neith Pacheco ^{1,*}

¹ Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco CIATEJ Unidad Sureste, Parque Científico Tecnológico de Yucatán, Km 5.5 Carretera Sierra Papacal-Chuburná Puerto, Mérida CP 97302, Mexico; npacheco@ciatej.mx (N.M.-T.); tayora@ciatej.mx (T.A.-T.); msanchez@ciatej.mx (A.S.-C.)

² CIATEJ Unidad Zapopan, Camino Arenero 1227, El Bajío del Arenal, 45019 Zapopan Jalisco, Mexico; hspinosa@ciatej.mx

* Correspondence: npacheco@ciatej.com; Tel.: +52-(33)-33455200 (ext. 4024)

Academic Editor: Leo Condron

Received: 31 May 2017; Accepted: 30 June 2017; Published: 7 July 2017

Abstract: Vegetable sources and agro-industrial residues represent an important source of phenolic compounds that are useful in a wide range of applications, especially those with biological activities. Conventional techniques of phytochemical extraction have been associated with a high consumption of organic solvents that limits the application of bioactive extracts, leading to the implementation of novel extraction technologies using mechanisms such as Ultrasound Assisted Extraction (UAE). In the present review, an analysis of the involved variables in the extraction yield of phenolic compounds through UAE is presented, highlighting the advantages of this technology based on the results obtained in various optimized studies. A comparison with other technologies and a proposal of its possible application for agro industrial residues as raw material of phenolic compounds is also indicated. Finally, it is concluded that UAE is a technology that is placed within the area of Sustainable Chemistry since it promotes the use of renewable raw materials through the extraction of phenolic compounds, implementing the substitution of organic