

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**Trabajo de disertación de grado**

Aislamiento, caracterización y análisis proximal del ácido hialurónico en dos pulpos ecuatorianos: *Octopus mimus* y *Octopus oculifer*

Disertación previa a la obtención del título de Químico

Wagner Guillermo Terán Chávez

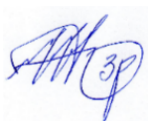
Quito, 2023



**CERTIFICACIÓN DEL DOCENTE- DIRECTOR DEL TRABAJO DE  
INTEGRACIÓN CURRICULAR  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
CARRERA DE QUÍMICA**

Yo, Pablo Efraín Pozo Pantoja Mgtr, con cédula de ciudadanía 1001219904, certifico que el presente trabajo de integración curricular “Aislamiento, caracterización y análisis proximal del ácido hialurónico en dos pulpos ecuatorianos: *Octopus mimus* y *Octopus oculifer*” elaborado por el estudiante Wagner Guillermo Terán Chávez, con cédula de ciudadanía 1752078293 ha concluido de acuerdo con las normas vigentes de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Atentamente,



**DIRECTOR / TUTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN  
C.C. 1001219904  
FECHA: 16/06/2023**

## DEDICATORIA

*A mis padres, por haberme acompañado y apoyado en cada etapa de mi vida,*

*A mi hermana mayor, por ser mi ejemplo a seguir y demostrarme que uno mismo forja su  
camino,*

*A mi tía, por brindarme la oportunidad de soñar y seguir la carrera que me apasiona.*

## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría mencionar a varias personas a las que quiero agradecer por brindarme su apoyo incondicional. Quisiera mencionar a mis padres por el cariño que me han demostrado día a día, por sus enseñanzas y valores que aun sigo poniendo en práctica, por su fe, dedicación y sacrificios que han dado para que yo pueda surgir y desarrollarme como persona de bien. A mi hermana mayor, por enseñarme a formar y seguir mi propio camino, por haberme dado pautas y consejos diarios para afrontar cada momento de mi vida. A mi tía Susana, por siempre acompañarme cada momento de mi vida desde que tengo memoria, por sus cuidados, consejos y cariño incondicional, por confiar en mí y darme la oportunidad de estudiar la carrera que elegí.

También quisiera mencionar a mi director de disertación, el Mtr. Pablo Pozo. Gracias a él conocí la carrera en la que llegué a formarme. Por charla y sus palabras pude comprender lo especial y fascinante que significa la química para mí, llegando a ser mi guía en un momento duro de mi vida. Gracias por el apoyo que me ha brindado durante el transcurso de la carrera, por haber creído en mí y llegarme a instruir a cada momento.

Agradezco a mis amigos y compañeros de la carrera, en especial a Daniel, Karen, Karina y Adriana; por haberme dado ánimos, sonrisas, compañía y fuerza en estos últimos 4 años.

Finalmente me gustaría terminar con una frase que me ha marcado desde que era pequeño de la cual pude formar mi carácter y mis sueños:

“Las circunstancias en que uno nace no tienen importancia, es lo que uno hace con el don de la vida lo que nos dice quiénes somos.” Yuyama, K. (1998). Pokémon the First Movie: Mewtwo Strikes Back [Película]. Oriental Light and Magic (OLM), Shogakukan-Shueisha Productions, TV Tokyo, Nintendo, Media Factory, Game Freak Inc., 4Kids, Pikachu Project



**TABLA DE CONTENIDOS**

1. RESUMEN .....	1
2. ABSTRACT .....	3
3. INTRODUCCIÓN.....	5
3.1. Descripción del ácido hialurónico .....	5
3.2. Disposición en la naturaleza .....	5
3.3. Propiedades del ácido hialurónico.....	6
3.4. Aplicaciones del ácido hialurónico.....	6
3.5. Fuentes de extracción .....	7
3.6. Pulpo ecuatoriano .....	7
3.7. Alcance .....	8
3.8. Justificación .....	8
3.9. Objetivos.....	9
3.9.1. Objetivo General .....	9
3.9.2. Objetivos específicos .....	9
4. METODOLOGÍA.....	9
4.1. Recolección de muestras .....	9
4.2. Codificación de la muestra .....	10
4.3. Proceso de extracción del ácido hialurónico.....	10
4.3.1. Procesos de lavado .....	10
4.3.2. Extracción.....	11
4.3.3. Identificación.....	11
4.4. Análisis proximal .....	11
4.4.1. Humedad .....	11
4.4.2. Cenizas.....	12
4.4.3. Grasa.....	13
4.4.4. Proteínas .....	14

4.4.5. Carbohidratos .....	15
5. RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	15
5.1. Extracción de ácido hialurónico.....	15
5.2. Caracterización FTIR .....	18
5.3. Análisis proximal .....	23
5.3.1. Humedad .....	23
5.3.2. Cenizas.....	23
5.3.3. Grasa.....	24
5.3.4. Proteínas .....	25
5.3.5. Carbohidratos .....	26
5.3.6. Composición centesimal .....	26
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	27
7. REFERENCIAS .....	28
8. ANEXOS .....	33
8.1. Cálculo de masas de reactivos para el proceso de lavado.....	33
8.1.1. Cloroformo.....	33
8.1.2. Acetona .....	34
8.1.3. Acetato de sodio .....	35
8.1.4. Formaldehido.....	36
8.1.5. Precipitación con acetona .....	38
8.2. Figuras del proceso.....	41
8.3. Figuras del análisis proximal .....	46
8.4. Espectros IR individuales .....	49

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cantidad de ácido hialurónico extraído de 100g en muestras <i>O.o.</i> ( <i>O. oculifer</i> ) .....	15
Tabla 2. Cantidad de ácido hialurónico extraído de 100g en muestras <i>O.m.</i> ( <i>O. mimus</i> ).....	16
Tabla 3. Comparativa de los 5 picos de la muestra comercial en los productos obtenidos .....	21
Tabla 4. Comparativa de picos de las muestras de ácido hialurónico extraídas junto a rangos de picos presentes en la literatura.....	22
Tabla 5. Porcentaje de humedad en muestras <i>O.o.</i> ( <i>O. oculifer</i> ) .....	23
Tabla 6. Porcentaje de humedad en muestras <i>O.m.</i> ( <i>O. mimus</i> ).....	23
Tabla 7. Porcentaje de cenizas en muestras <i>O.o.</i> ( <i>O. oculifer</i> ).....	23
Tabla 8. Porcentaje de cenizas en muestras <i>O.m.</i> ( <i>O. mimus</i> ).....	24
Tabla 9. Porcentaje de grasa en muestras de <i>O.o.</i> ( <i>O. oculifer</i> ) .....	24
Tabla 10. Porcentaje de grasa en muestras <i>O.m.</i> ( <i>O. mimus</i> ).....	24
Tabla 11. Porcentaje de proteínas en muestras <i>O.o.</i> ( <i>O. oculifer</i> ) .....	25
Tabla 12. Porcentaje de proteínas en muestras <i>O.m.</i> ( <i>O. mimus</i> ).....	25
Tabla 13. Composición centesimal de las muestras de pulpo .....	27
Tabla 14. Masa de cloroformo necesario para el <i>Octopus oculifer</i> .....	39
Tabla 15. Masa de cloroformo necesario para el <i>Octopus mimus</i> .....	39
Tabla 16. Masa de acetona, acetato de sodio y formaldehído necesario para el <i>Octopus oculifer</i> .....	40
Tabla 17. Masa de acetona, acetato de sodio y formaldehído necesario para el <i>Octopus mimus</i> .....	40
Tabla 18. Volumen de agua necesaria para la masa del <i>Octopus oculifer</i> .....	40
Tabla 19. Volumen de agua necesaria para la masa del <i>Octopus mimus</i> .....	40
Tabla 20. Valores de acetona requeridos para generar precipitación en muestras <i>Octopus oculifer</i> .....	40

Tabla 21. Valores de acetona requeridos para generar precipitación en muestras <i>Octopus mimus</i> .....	41
Tabla 22. Factor de corrección del HCl .....	41

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del ácido hialurónico .....	5
Figura 2. Espécimen <i>Octopus oculifer</i> .....	10
Figura 3. Espécimen <i>Octopus mimus</i> .....	10
Figura 4. Ácido hialurónico sólido extraído del <i>O.o.</i> ( <i>O. oculifer</i> ) .....	16
Figura 5. Ácido hialurónico sólido extraído del <i>O.m.</i> ( <i>O. mimus</i> ) .....	17
Figura 6. Espectros IR de agua y muestra de grado comercial .....	20
Figura 7. Espectros IR de ácido hialurónico de las muestras <i>O.o.</i> ( <i>O. oculifer</i> ) ....	20
Figura 8. Espectros IR de ácido hialurónico de las muestras <i>O.m.</i> ( <i>O. mimus</i> ) ....	21
Figura 9. Pesaje inicial de <i>O.o.</i> ( <i>O. oculifer</i> ) muestra #1 .....	42
Figura 10. Pesaje inicial de <i>O.o.</i> ( <i>O. oculifer</i> ) muestra #2 .....	42
Figura 11. Pesaje inicial de <i>O.o.</i> ( <i>O. oculifer</i> ) muestra #3 .....	42
Figura 12. Lavados con cloroformo de las muestras <i>O.o.</i> ( <i>O. oculifer</i> ) .....	43
Figura 13. Disolución a pH alcalino de la muestra #1 <i>O.o.</i> ( <i>O. oculifer</i> ).....	43
Figura 14. Disolución a pH alcalino de la muestra #2 <i>O.o.</i> ( <i>O. oculifer</i> ).....	43
Figura 15. Disolución a pH alcalino de la muestra #3 <i>O.o.</i> ( <i>O. oculifer</i> ).....	44
Figura 16. Pesaje inicial <i>O.m.</i> ( <i>O. mimus</i> ) muestra #1 .....	44
Figura 17. Pesaje inicial <i>O.m.</i> ( <i>O. mimus</i> ) muestra #2 .....	44
Figura 18. Pesaje inicial <i>O.m.</i> ( <i>O. mimus</i> ) muestra #3 .....	45
Figura 19. Lavados de cloroformo de las muestras <i>O.m.</i> ( <i>O. mimus</i> ).....	45
Figura 20. Disolución a pH alcalino de la muestra #1 <i>O.m.</i> ( <i>O. mimus</i> ).....	45
Figura 21. Disolución a pH alcalino de la muestra #2 <i>O.m.</i> ( <i>O. mimus</i> ).....	46
Figura 22. Disolución a pH alcalino de la muestra #3 <i>O.m.</i> ( <i>O. mimus</i> ).....	46
Figura 23. Homogenización de muestras .....	47
Figura 24. Muestra de pulpo homogenizada .....	47
Figura 25. Muestra de pulpo después del proceso de humedad .....	47
Figura 26. Muestra de pulpo después del proceso de cenizas .....	48

Figura 27. Extracción de grasa por el método de Folch .....	48
Figura 28. Digestión ácida a muestra de pulpo .....	48
Figura 29. Destilación a disolución ácida de pulpo .....	49
Figura 30. Titulación para obtención del valor de proteínas .....	49
Figura 31. Espectro IR de muestra <i>O.o.</i> ( <i>O. oculifer</i> ) #1.....	50
Figura 32. Espectro IR de muestra <i>O.o.</i> ( <i>O. oculifer</i> ) #2.....	50
Figura 33. Espectro IR de muestra <i>O.o.</i> ( <i>O. oculifer</i> ) #3.....	51
Figura 34. Espectro IR de muestra <i>O.m.</i> ( <i>O. mimus</i> ) #1.....	51
Figura 35. Espectro IR de muestra <i>O.m.</i> ( <i>O. mimus</i> ) #2.....	52
Figura 36. Espectro IR de muestra <i>O.m.</i> ( <i>O. mimus</i> ) #3.....	52
Figura 37. Espectro IR de muestra de grado comercial.....	52
Figura 38. Espectro IR del agua.....	53

## 1. RESUMEN

El ácido hialurónico es un polisacárido largo (biopolímero natural) que se encuentra presente en el humor vítreo y los tejidos blandos de los seres vivos desempeñando las funciones de conservación de elastoviscosidad de los tejidos conjuntivos, ensamblaje supramolecular, control de hidratación y transporte de agua dentro del organismo. Ha llegado a utilizarse dentro del campo de la medicina por su alta biocompatibilidad para el desarrollo tratamiento de suplementación de líquido articular en artritis y auxiliar en cirugías oculares. Además, de poseer una alta capacidad de retención de agua y viscoelasticidad se lo ha empleado dentro de formulaciones de cosméticos enfocados cuidado de la piel. Sus fuentes de extracción más estudiadas involucran los ojos de pescado y las crestas de gallo. Aun así, existen una gran variedad de fuentes, tanto marinas como terrestres, de las que se puede extraer dicho polisacárido e incluso, pueden existir ciertas especies que pueden surgir como nuevas opciones de extracción, entre el pulpo. El trabajo de disertación tuvo como objetivo aislar, caracterizar y realizar análisis proximal del ácido hialurónico en dos pulpos ecuatorianos: *Octopus mimus* y *Octopus oculifer*. Para el proceso de extracción se utilizó la metodología empleada para crestas de gallo, y esta se la realizó entre los meses de enero y febrero del 2023. La caracterización de los productos extraídos se llevó a cabo por espectroscopía Infrarroja (FTIR) junto con una comparativa de una muestra de grado comercial. El análisis proximal de las dos especies de pulpo se enfocó en el estudio de: humedad por el método AOAC 934.01, grasa por el método de Folch, proteínas por el método de Kjeldahl AOAC 2001.11 y cenizas por el método Norma Internacional ISO R-936. Como resultado, se logró extraer el ácido hialurónico de ambas especies de pulpo alcanzando un rendimiento de 3,63 mg/g para la especie *O. oculifer* y 0,72 mg/g para la especie *O. mimus*. En base a la caracterización de los productos extraídos se los pudo identificar como ácido hialurónico por la presencia de 5 picos característicos en base a la literatura y de la muestra comercial: un pico en  $3279\text{ cm}^{-1}$  (enlace O-H), un pico en  $2946\text{ cm}^{-1}$  (enlace C-H), un pico en  $1643\text{ cm}^{-1}$  (enlace N-H), un pico en  $1390\text{ cm}^{-1}$  (enlace C=O) y un pico en  $1042\text{ cm}^{-1}$  (enlace C-O-C). En cuanto al análisis proximal, se obtuvo una correlación de los valores junto a la literatura presentando en ambas especies un alto contenido de humedad, 83,577% para el *O. oculifer* y 82,378% para el *O. mimus*; seguido de

un contenido proteico de 3,875% y 3,553%, respectivamente. Se concluye que las dos especies de pulpos ecuatorianos presentan un contenido adecuado de ácido hialurónico lo cual puede darles un nuevo enfoque y uso dentro del Ecuador.

**Palabras Claves:** Ácido hialurónico, *Octopus mimus*, *Octopus oculifer*, extracción, análisis proximal

## 2. ABSTRACT

Hyaluronic acid is a long polysaccharide (natural biopolymer) that is present in the vitreous humor and soft tissues of living beings, performing the functions of conserving the elastoviscosity of connective tissues, supramolecular assembly, hydration control, and water transport of the body. organism. It has come to be used within the field of medicine due to its high biocompatibility for the development of joint fluid supplementation treatment in arthritis and auxiliaries in eye surgeries. In addition, having a high water retention capacity and viscoelasticity, it has been used in cosmetic formulations focused on skin care. Its most studied sources of extraction involve fish eyes and rooster combs. Even so, there is a wide variety of sources, both marine and terrestrial, from which said polysaccharide can be extracted and there may even be certain species that may emerge as new extraction options, among the octopus. The dissertation work aimed to isolate, characterize and perform proximal analysis of hyaluronic acid in two Ecuadorian octopuses: *Octopus mimus* and *Octopus oculifer*. For the extraction process, the methodology used for combs of rooster was obtained, which was carried out between the months of January and February 2023. The characterization of the extracted products was carried out by Infrared spectroscopy (FTIR) together with a comparison of a commercial grade sample. The proximal analysis of the two octopus species focused on the study of: moisture by the AOAC 934.01 method, fat by the Folch method, proteins by the Kjeldahl AOAC 2001.11 method and ashes by the International Standard ISO R-936 method. As a result, hyaluronic acid will be removed from both pulp species reaching a yield of 3,63 mg/g for *O. oculifer* species and 0,72 mg/g for *O. mimus* species. Based on the characterization of the extracted products, they could be identified as hyaluronic acid by the presence of 5 characteristic peaks based on the literature and the commercial sample: a peak at  $3279\text{ cm}^{-1}$  (O-H bond), a peak at  $2946\text{ cm}^{-1}$  (C-H bond), a peak at  $1643\text{ cm}^{-1}$  (N-H bond), a peak at  $1390\text{ cm}^{-1}$  (C=O bond) and a peak at  $1042\text{ cm}^{-1}$  (C-O-C bond). Regarding the proximal analysis, a correlation of the values was obtained together with the literature presented in both species with a high moisture content, 83.577% for *O. oculifer* and 82.378% for *O. mimus*; followed by a protein content of 3.875% and 3.553%, respectively. It is concluded that the two species of Ecuadorian

octopus have an adequate content of hyaluronic acid, which can give them a new focus and use within Ecuador.

**Keywords:** Hyaluronic acid, *Octopus mimus*, *Octopus oculifer*, extraction, proximal analysis

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1. Descripción del ácido hialurónico

El ácido hialurónico es un polisacárido largo, el cual se compone por disacáridos repetitivos de ácido glucurónico y N-acetil-D-glucosamina enlazados por medio de uniones u enlaces  $\beta$  1-3 y  $\beta$  1-4 de manera lineal (Abatangelo, Vindigni, Avruscio, Pandis & Brun, 2020), tal como se muestra en la Figura 1.

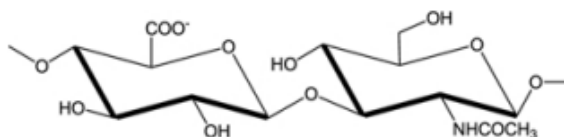


Figura 1. Estructura del ácido hialurónico

Su descubrimiento se remonta en el año de 1934, donde John Palmer y Karl Meyer detallaron la presencia de una sustancia mucoide, la cual fue aislada del humor vítreo bovino en condiciones ácidas (Guevara & Sandoval, 2021); pero su estructura fue descrita hasta 20 años después.

Entre los años de 1948 a 1951, hubo un auge por investigar, analizar y definir la estructura del ácido hialurónico. Concretamente en el año de 1951, los científicos Oston y Stanier dieron la primera información sobre la estructura de dicha macromolécula logrando definir un sinnúmero de propiedades de la misma (Arévalo, 2019). Durante la segunda mitad del siglo XX, se desarrollaron una gran variedad de estudios del ácido hialurónico dentro de diversas ramas científicas destacando la medicina y la glicobiología (Arévalo, 2019).

Cabe destacar que, en el año de 1986, Balazs, presentó la sal correspondiente de dicho ácido como una alternativa para los usos que se están desarrollando (Abatangelo et al, 2020). Un ejemplo de ello es su uso en el ámbito médico para protección de heridas y quemaduras de la piel para una óptima recuperación.

#### 3.2. Disposición en la naturaleza

El ácido hialurónico se le puede encontrar en los tejidos conectivos blandos de todos los seres vivos, en líquido sinovial y su mayor proporción, en base a concentración, se encuentra en el cuerpo vítreo del ojo y en el cordón umbilical. Necas, Bartosikva, Brauner & Kolar (2008), mencionan que el ácido hialurónico

también puede encontrarse, con cantidades más pequeñas pero significativas, en los tejidos pulmonares, cerebrales y musculares. Además, se ha encontrado ácido hialurónico en el interior de las células, concretamente en el área perinuclear de las células del músculo liso aórtico y en las estructuras del citoplasma (Abatangelo et.al, 2020).

Entre sus funciones destacan: el mantenimiento de la elastoviscosidad de los tejidos conjuntivos líquidos, el control de la hidratación tisular y el transporte de agua, el ensamblaje supramolecular en la matriz extracelular, lubricación de las partes móviles como articulaciones y músculos (Necas, et.al, 2008).

### 3.3. Propiedades del ácido hialurónico

Considerado como biopolímero natural, que se comprende de entre 100 a 20 000 unidades repetidas de su monómero detallado en la Figura 1. Presenta una fórmula molecular  $(C_{14}H_{21}NO_{11})_n$ . Su peso molecular puede variar dependiendo de su fuente de extracción, lo cual tiende a presentarse desde un orden de magnitud de  $10^4$  hasta un valor de  $10^7$  Da aproximadamente (Arévalo, 2019).

Su estructura tiene la característica notable sobre la retención de agua, la cual puede atrapar 1000 veces su peso en agua aproximadamente (Bukhari, Roswandi, Waqas, Hussain, Khan, Sohail, Amlizan, Ei & Hussain, 2018). Además, es descrita como una molécula muy hidrofílica, siendo considerado un humectante natural, debido a la presencia de grupos carboxilo dando la formación de una red viscosa (Abatangelo et.al, 2020). Por lo que su viscosidad es alta, la cual también varía según el peso molecular.

### 3.4. Aplicaciones del ácido hialurónico

Necas et.al (2008), mencionan que gracias a sus propiedades viscoelásticas tiene una gran importancia dentro del campo de la medicina siendo usada en tratamiento de suplementación de líquido articular en artritis y auxiliar en cirugías oculares. Además, por su consistencia, capacidad de retención de agua y una buena biocompatibilidad, es muy usado dentro del campo de la cosmética siendo empleado en formulaciones de productos para el cuidado de la piel, destacando su rol como buen humectante (Bukhari et.al, 2018). Dichas propiedades permiten que la piel pueda mantener una buena elasticidad, turgencia y humedad.

### 3.5. Fuentes de extracción

Una gran diversidad de estudios realizados tienden a utilizar partes de la estructura de animales como matrices de extracción del ácido hialurónico. Concretamente una de las fuentes con mayores estudios es el humor vítreo proveniente de los peces, con el cual se puede realizar un proceso de extracción química o enzimático (Meza, 2018), donde su rendimiento puede variar dependiendo del tipo de especie utilizada, oscilando entre un rango de  $8 \cdot 10^{-3}\%$  a  $2,2 \cdot 10^{-3}\%$ .

La segunda matriz mayormente utilizada son los restos de los pollos, destacando las crestas, piel y tejidos cartilagosos; presentando una concentración de 17,9  $\mu\text{g}/\text{mg}$  (Abdallah, Fernandez, Matias & Rosario, 2020).

Entre otro tipo de matrices se puede mencionar:

- Tiburones: presente dentro del humor vítreo, llegando a tener una concentración de 0,3g/L (Abdallah et.al, 2020).
- Moluscos: presente en su tejido, alcanzando un valor de 0,81 mg/g en función del peso del tejido seco (Abdallah et.al, 2020).
- Bovino: presente en el líquido sinovial, presentándose un valor de 8 a 45 mg/L (Murado, Montemayor, Cabo, Vázquez & González, 2012).
- Mantarraya: tejido cartilaginoso, logrando un rendimiento de 0,80 mg/g en relación al peso del tejido seco (Sadhasivam, Muthuvel, Pachaiyappan & Thangavel, 2013).

Incluso, se ha realizado un estudio sobre la identificación de ácido hialurónico en los cartílagos de los calamares (Habuchi, Taen, Sato, Washino & Takeuchi, 1983). Concretamente, para el pulpo no se han realizado estudios de extracción de ácido hialurónico, pero si para la extracción e identificación de sulfato de condroitina o glucosaminoglucano sulfatado (Abdallah et.al, 2020).

### 3.6. Pulpo ecuatoriano

La palabra cefalópodo proviene del griego *Khepalos*, la cual significa cabeza y *Podos*, que significa pie. Dicha terminología detalla la descripción de un animal invertebrado, compuesto por una cabeza desarrollada la cual se encuentra rodeada por largos tentáculos o pies, los cuales presentan múltiples ventosas (Murcia, 2015). Existe una variedad de especies de cefalópodos, destacando los conocidos

octópodos o comúnmente llamados pulpos; presentando una gran variedad de especies existentes en el mundo (Sauer et.al, 2021). Concretamente, en territorio ecuatoriano, existen 2 especies de pulpos: el *Octopus mimus* y el *Octopus oculifer* (Simbaña, 2017); ambas pertenecientes al phylum *Mollusca*, clase *Cephalopoda*, orden *Octapoda*, familia *Octopodidae* y género *Octopus*.

Estos animales tienen una gran demanda de pesca donde su captura puede darse por el intermareal y submareal rocoso. La principal utilidad de los pulpos radica dentro del ámbito de la gastronomía destacando una gran variedad de platos como: cazuela de pulpo, ceviche, aguachile, entre otros (Quezada & Florero, 2021).

### 3.7. Alcance

El estudio se realizó durante los meses de enero y febrero del 2023, en el cual se analizó la presencia de ácido hialurónico en dos especies de pulpos ecuatorianos y así verificar su viabilidad como tentativa fuente de extracción.

### 3.8. Justificación

El ácido hialurónico ha tenido un gran desarrollo dentro de la producción de cosméticos, en el campo de la medicina y en el campo de investigación. Por lo que, ha provocado un incremento en su uso, comercialización y demanda en el mercado. Su extracción proviene a partir de organismos vivos teniendo fuentes terrestres y fuentes marítimas, en donde su presencia y concentración varía según la matriz.

En el territorio ecuatoriano, se tiene una gran diversidad de fauna de la cual se podría analizar la presencia y extracción el ácido hialurónico. En esto se destaca el pulpo, un animal compuesto por un tejido cartilaginoso, donde los músculos de sus brazos presentan tejido conectivo y fibras colágenas (Zamora & Olivares, 2014). Debido a la composición de su organismo y alta demanda de pesca, se lo puede considerar una matriz tentativa para la extracción de ácido hialurónico. Debido, a la ausencia de estudios acerca de la presencia del ácido hialurónico en pulpos del territorio ecuatoriano se planteó el análisis y proceso de extracción de dicho polisacárido lo cual llegaría a darle al pulpo un nuevo enfoque de aplicabilidad aparte de su relevancia en el ámbito de la gastronomía.

### 3.9. Objetivos

#### 3.9.1. Objetivo General

Aislar, caracterizar y realizar análisis proximal del ácido hialurónico en dos pulpos ecuatorianos: *Octopus mimus* y *Octopus oculifer*, para ser catalogados como fuentes tentativas de extracción

#### 3.9.2. Objetivos específicos

- Extraer del ácido hialurónico a partir del seguimiento de metodologías realizadas en matrices como crestas de gallo.
- Caracterizar por espectrofotometría IR el ácido hialurónico extraído y compararlo con el espectro teórico comprobando su estructura.
- Realizar el análisis proximal de los pulpos mediante la determinación: humedad (AOAC 934.01), grasas por método Folch, proteínas por el método Kjeldahl (AOAC 2001.11), y cenizas (Norma Internacional ISO R-936).

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1. Recolección de muestras

Las muestras de los pulpos se consiguieron en el “Mercado Mayorista” del Distrito Metropolitano de Quito; lugar en el que se tenía a disposición las 2 especies de interés

Ambas muestras de pulpo fueron lavadas, refrigeradas y congeladas para conservación de la materia prima. Posteriormente, fueron descongeladas, cortadas en pequeñas porciones para sacar muestras representativas y ser usados en el laboratorio.

Adicionalmente, se compró una muestra de 30 g de ácido hialurónico de grado cosmético como muestra estándar.



Figura 2. Espécimen *Octopus oculifer*



Figura 3. Espécimen *Octopus mimus*

#### 4.2. Codificación de la muestra

Por la simplicidad de etiquetado durante la experimentación, al *Octopus mimus* se lo denominó *O.m.* y al *Octopus oculifer* se lo denominó *O.o.* Se realizó 3 repeticiones de cada método desarrollado para cada pulpo.

#### 4.3. Proceso de extracción del ácido hialurónico

##### 4.3.1. Procesos de lavado

Se pesó una cantidad de pulpo de 100 g (aproximadamente) y se colocó dentro de un vaso de precipitación de 1L. Se vertió cloroformo sobre la muestra en base a la relación: 1L cloroformo por 1 kg de pulpo (Alessandrello, Aquino, Duarte, & Pereda, 2020). Con ayuda de un agitador magnético, se dejó en agitación durante 24 horas. Al cumplir el tiempo establecido, se filtró al vacío hasta la obtención de la muestra orgánica húmeda, se la dejó secar y posteriormente, se redujo su tamaño con ayuda de un triturador de alimentos. Se transfirió la muestra triturada a un vaso de precipitación de 1L, donde se adicionó 1 kg de acetona, 0,1

kg formaldehído y 0,05 kg de acetato de sodio por cada kg de pulpo pesado inicialmente (Alessandrello et.al, 2020). Se introdujo un agitador magnético, se tapó el vaso y se dejó en agitación por 24 horas. Al culminar el tiempo determinado, se filtró al vacío, se realizó lavados sucesivos con acetona a la muestra sólida y se la dejó secar a temperatura ambiente.

#### 4.3.2. Extracción

En un vaso de precipitación de 500 mL se colocó 225 mL de agua destilada. Junto a la ayuda de un potenciómetro, se adicionó gotas de NaOH 5N hasta que se obtuvo una solución básica de pH 10. Al tener dicha condición, se adicionó la muestra seca y se dejó en agitación por alrededor de 96 horas. Pasado dicho tiempo, se filtró la mezcla separando la fase líquida y la fase sólida. Se pesó la fase líquida y se la transfirió a un vaso de precipitación de 1L. Se adicionó acetona a la solución en la proporción de 2L de acetona por cada kg de solución (Alessandrello et.al, 2020). Se filtró al vacío, se realizó lavados sucesivos con acetona al precipitado. Posteriormente, se colocó la muestra en un rotavapor y se la dejó hasta eliminación del solvente. Se trasvasó la muestra a un vaso de precipitación de 25mL y se lo colocó sobre una plancha de calentamiento a 60° C por 15 minutos y finalmente, se pesó el sólido obtenido y se lo almacenó para su identificación.

#### 4.3.3. Identificación

Se llevó la muestra sólida al equipo de espectrofotometría FTIR. Se configuró el equipo en un rango de 4000 a 510  $\text{cm}^{-1}$  para obtención del espectro. Posteriormente se leyó una muestra de grado comercial. Los picos obtenidos fueron analizados por la base de datos y los espectros fueron guardados para su uso posterior.

### 4.4. Análisis proximal

#### 4.4.1. Humedad

Se secó previamente una cápsula de porcelana dentro de una estufa a 100-105°C por 1 hora. Pasado este tiempo se dejó enfriar y con ayuda de unas pinzas se lo lleva a un desecador hasta su uso (AOAC International, 1990).

Se cortó unas pequeñas partes de pulpo, se redujeron su tamaño con ayuda de un triturador de alimentos hasta formar una muestra homogenizada.

Con ayuda de una balanza analítica, se pesó la cápsula de porcelana vacía (previamente tratada) y posteriormente, se pesó 5 gramos de muestra triturada. Se introdujo la cápsula en la estufa a una temperatura de 105°C por una hora. Pasado este tiempo, se dejó enfriar y se transfirió la cápsula de porcelana a un desecador. Ya completamente frío, se pesó el contenido y se calculó el porcentaje de humedad.

La fórmula utilizada fue la siguiente:

$$\%Humedad = 100 - \left( \frac{M2-M0}{M1-M0} \right) * 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde:

M0: cápsula vacía

M1: cápsula + pulpo antes del secado

M2: cápsula + pulpo seco

#### 4.4.2. Cenizas

Se secó previamente un crisol de porcelana dentro de una estufa a 100-105°C por 1 hora. Pasado este tiempo se dejó enfriar y con ayuda de unas pinzas se lo lleva a un desecador hasta su uso.

Se cortó unas pequeñas partes de pulpo, se redujeron su tamaño con ayuda de un triturador de alimentos hasta formar una muestra homogenizada. Con ayuda de una balanza analítica, se pesó el crisol vacío (previamente tratado) y posteriormente, se pesó 5g de muestra triturada.

Se colocó el crisol en una mufla reguladora a una temperatura inicial de 105°C por 30 minutos. Posteriormente, se fue aumentando progresivamente la temperatura, la cual llegó a los 525°C y se mantuvo el crisol hasta la obtención de cenizas (INEN, 2013). Después, se dejó enfriar y se transfirió el crisol de porcelana a un desecador. Ya completamente frío, se pesó el contenido y se calculó el porcentaje de cenizas.

La fórmula utilizada fue la siguiente:

$$\%Cenizas = \left( \frac{C2-C0}{C1-C0} \right) * 100 \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde:

C0: crisol vacío

C1: crisol + muestra de pulpo

C2: crisol + residuos

#### 4.4.3. Grasa

Se cortó y trituró una cantidad de pulpo hasta formar una muestra homogenizada. Después, se pesó 10 gramos de la muestra y se colocó en un vaso de precipitación de 400 mL. Se adicionó 30 mL de reactivo de Folch, se agitó por unos 3 minutos, se filtró al vacío y la parte líquida se trasladó a un embudo de separación de 1L. Nuevamente, se tomó la misma muestra sólida en el vaso de 400 mL, se adicionó 25 mL de reactivo de Folch, se agitó por 3 minutos, se filtró al vacío y la fase líquida se la trasladó al mismo embudo de separación que contenía la primera disolución. Este proceso se repitió una vez más (Ayala, Hernández & Aguilera, 2008). Posteriormente, se agregó al embudo 20 mL de NaCl al 0,73%, se agitó la disolución liberando la presión cada cierto tiempo. Se envolvió el embudo con papel aluminio y se lo dejó en reposo en la sorbona por 24 horas.

Pasado el intervalo de tiempo, se extrajo la fase líquida inferior formada en el embudo directamente en un balón esmerilado previamente pesado. Se adicionó 25 mL de una mezcla que contenía 20 mL de reactivo de Folch y 5 mL de NaCl al 0,58% en el embudo de separación (Ayala, Hernández & Aguilera, 2008). Nuevamente se agitó el contenido, se dejó en reposo por 10 minutos y se volvió a extraer la fase inferior formada en el balón esmerilado. Dicho balón fue llevado al rotavapor y se lo dejó hasta eliminación del solvente. Finalmente, se pesó el balón con el residuo obtenido y se calculó el porcentaje de grasa.

Para la obtención del valor de la grasa se utilizó la siguiente expresión:

$$\%Grasa = \left( \frac{G2-G0}{G1} \right) * 100 \quad \text{(Ecuación 3)}$$

Donde:

G0: balón vacío

G1: muestra de pulpo

G2: balón + grasa

#### 4.4.4. Proteínas

Se cortó y trituró una cantidad de pulpo para homogenización. Luego, se pesó, 2 g aproximadamente de muestra. Posteriormente, la muestra se colocó dentro de un tubo Kjeldahl y se adicionó 3 núcleos de ebullición, 20 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (c) y una pastilla catalítica (AOAC International, 2002). Se repitió este proceso sin muestra para elaboración de un blanco. Se colocó los tubos Kjeldahl en el digestor, y se empezó una digestión a 150°C por 30 minutos. Posteriormente, se elevó la temperatura de la digestión a 300°C y se la dejó por 30 minutos. Pasado este tiempo, nuevamente se elevó la temperatura de la digestión a 400°C por 90 minutos.

Al terminar la digestión, se dejaron enfriar los tubos Kjeldahl, se adicionó 25 mL de agua destilada en cada tubo con extrema precaución y se agitó suavemente el contenido. Nuevamente, se dejaron enfriar los tubos a temperatura ambiente.

En un Erlenmeyer de 250 mL se agregó 50 mL de ácido bórico al 3% junto con 3 gotas de indicador mixto (azul de metileno y rojo de metilo). Después, se lo colocó en la salida del refrigerante del equipo destilador Kjeldahl. Se colocó en el dosificador un matraz que contenía NaOH al 40% y se posicionó el tubo Kjeldahl en el equipo. Se realizó una destilación hasta obtener 250 mL de muestra. Posteriormente, la muestra fue dividida en 3 partes de 83 mL aproximadamente, y finalmente se tituló cada muestra con HCl 0,1N.

Para el cálculo de las proteínas se ocupó la siguiente expresión:

$$\%N \text{ Total} = \frac{1,4 * N * Fc * (V1 - V2)}{M} \quad (\text{Ecuación 4})$$

$$\%Proteínas = \%Ntotal * 6,25 \quad (\text{Ecuación 5})$$

Donde:

N: Normalidad de HCl (0,1N)

Fc: Factor de corrección del ácido

V1: Volumen de ácido gastado en la titulación

V2: Volumen de ácido gastado en el blanco

M: peso de muestras en gramos

Para el factor de corrección se usó la siguiente expresión:

$$V * 0,1 * Fc = \frac{g}{\frac{PM}{2}} \quad (\text{Ecuación 6})$$

Donde:

V: Volumen usado de HCl en L

g: Gramos usado de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

PM: Peso molecular de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

#### 4.4.5. Carbohidratos

Se realizó la estimación de los carbohidratos por un cálculo de diferencia entre 100% con todos los resultados de humedad, cenizas, grasa y proteínas.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 5.1. Extracción de ácido hialurónico

El rendimiento obtenido a partir del *O. oculifer* corresponde a un valor de 3,63 mg/g y el rendimiento del *O. mimus* corresponde a un valor de 0,72 mg/g; siendo reportados en la tabla 1 y 2 respectivamente. Dichos valores se pueden evidenciar dentro de las Figuras 4 y 5, en donde claramente se observa un mayor contenido de producto seco en las del *O. oculifer*.

Los contenidos extraídos son inferiores a los reportados por Alessandro et.al (2020), en donde se usaron crestas de gallos como matriz de extracción obteniendo 0,4912 g de ácido hialurónico por 100g de crestas iniciales. Aun así, el contenido de ácido hialurónico extraído de los pulpos es comparable a otras fuentes marinas, como los moluscos y las mantarrayas 0,81 mg/g y 0,80 mg/g, respectivamente (Abdallah et.al, 2020).

Tabla 1. Cantidad de ácido hialurónico extraído de 100g en muestras O.o. (*O. oculifer*)

Número de muestra	Producto (±0,001g)
1	0,768
2	0,205
3	0,116
Promedio	0,363

Rendimiento (mg/g)	3,63
-----------------------	------

Tabla 2. Cantidad de ácido hialurónico extraído de 100g en muestras *O.m.* (*O. mimus*)

Número de muestra	Producto ( $\pm 0,001g$ )
1	0,084
2	0,078
3	0,055
Promedio	0,072
Rendimiento (mg/g)	0,72



Figura 4. Ácido hialurónico sólido extraído del *O.o.* (*O. oculifer*)



Figura 5. Ácido hialurónico sólido extraído del *O.m.* (*O. mimus*)

El uso principal del cloroformo en el primer proceso de lavado ayudó a la limpieza de residuos e impurezas de las muestras en su capa superficial. Además, también permitió la eliminación de ciertos lípidos y proteínas presentes en el tejido.

El objetivo del proceso de reducción de tamaño aumentó la superficie de contacto para posteriores lavados y de esta manera mejorar el proceso de extracción. Concretamente, las muestras de los pulpos fueron reducidos mediante un triturador de alimentos.

Los siguientes lavados fueron realizados con el propósito de reducir la solubilidad de las proteínas que aún persisten dentro de las muestras, por lo que se realizó un acondicionamiento con acetona, acetato de sodio y formaldehído. Dicha mezcla permite estabilizar las proteínas mientras las mismas cambian su conformación globular. De tal forma, quedan encapsuladas dentro del tejido, evitando así una posterior solubilidad en agua. Cabe mencionar, que el acetato de sodio, al ser una sal, tiende a aumentar la fuerza iónica de la mezcla y reduce el agua presente en las proteínas, causando un descenso en la solubilidad proteica (Wang, Jiang, Cai, Li, Li, Lin, Zenghong, Lijun, & Zhang, 2017). Además, el formaldehído provocaba un entrecruzamiento de las cadenas del ácido hialurónico presente dando un aumento de tamaño y peso molecular (Alessandrello et.al, 2020).

El paso siguiente, consiste en un lavado de las muestras trituradas con acetona, para un proceso de limpieza y remoción de los residuos de la mezcla acondicionadora y una fácil evaporación de dicho solvente. Por lo que, dejaba a las muestras de pulpo en óptimas condiciones para el proceso de extracción en fase acuosa. De esta manera, al sumergir las muestras trituradas de pulpo en agua alcalina, se tiende a extraer netamente el ácido hialurónico dentro de la solución. Por lo que, el último paso de adición de acetona a la solución alcalina, provoca la precipitación en sólido del producto deseado. Debido a que la acetona, promueve una deshidratación junto con una reducción de la constante dieléctrica del medio causando un aumento de las interacciones electrostáticas. De tal forma, disminuye la solubilidad del ácido hialurónico en el medio, lo cual lleva a su precipitación (Cavalcanti, de Melo, Ferreira, & Santana, 2020).

## 5.2. Caracterización FTIR

La espectroscopía Infrarroja permite el análisis de la radiación infrarroja sobre una muestra de interés. Una molécula en un estado basal presenta un tipo vibración específico, que luego de ser irradiada con energía infrarroja tiende a cambiar su intensidad vibratoria. Dicho cambio es posible gracias a la presencia de un momento dipolar en la molécula. Al hacer incidir un fotón, con una frecuencia igual con la que un enlace molecular tiende a cambiar su momento dipolar, sobre un dipolo se tiende a producir la absorción de dicho fotón causando un aumento de amplitud en el momento vibratorio de los enlaces (Cortez, 2017); pero se mantiene su modo de vibración junto a su frecuencia.

Cada molécula tendrá un tipo o modo de vibración, el cual dependerá de los átomos que la compongan como la fuerza de su enlace.

Los espectrómetros de infrarrojo tienden a dar una respuesta de la interacción de radiación infrarroja sobre una muestra de interés, dando como resultado un espectro IR, que se realiza dentro del intervalo del infrarrojo medio (4000 a 200  $\text{cm}^{-1}$ ). Cada pico tiende a representar un tipo de vibración específica, dividiendo dos rangos del espectro. El primer intervalo de entre 4000 a 1500  $\text{cm}^{-1}$ , representa la región de identificación de grupos funcionales. Y el segundo intervalo de 1500 a 600  $\text{cm}^{-1}$ , representa la región de la huella dactilar, siendo una zona compleja donde existen diversos estiramientos de enlaces a la vez difíciles de asociar a un solo tipo de enlace (Cortez, 2017); pero aun así se llegan a considerar ciertos enlaces para análisis del espectro.

La región de grupos funcionales puede subdividirse 3 rangos específicos (Cortez, 2020):

- Entre 4000 a 2500  $\text{cm}^{-1}$ : Se representan grupos funcionales de enlace simple (C-H, N-H, O-H). Uno de ellos es el O-H el cual puede encontrarse entre los 3500 a 3200  $\text{cm}^{-1}$ . Comúnmente se lo asocia al agua, catalogado como uno de los interferentes más grandes dentro del análisis por infrarrojo.
- Entre 2500 a 2000  $\text{cm}^{-1}$ : Se representan grupos funcionales con triple enlace. Normalmente son picos pequeños los cuales no son muy considerados para la interpretación de un espectro IR.

- Entre 2000 a 1500  $\text{cm}^{-1}$ : Se representan grupos funcionales con doble enlace como por ejemplo C=O y C=C.

Con el fin de verificar la estructura del ácido hialurónico de las muestras extraídas se realizaron los espectros IR con ayuda del software Origin 2022. La Figura 6 comprende a la señal de la muestra comercial mientras que las Figuras 7 y 8 contienen las señales de las muestras del *O. oculifer* y *O. mimus* respectivamente.

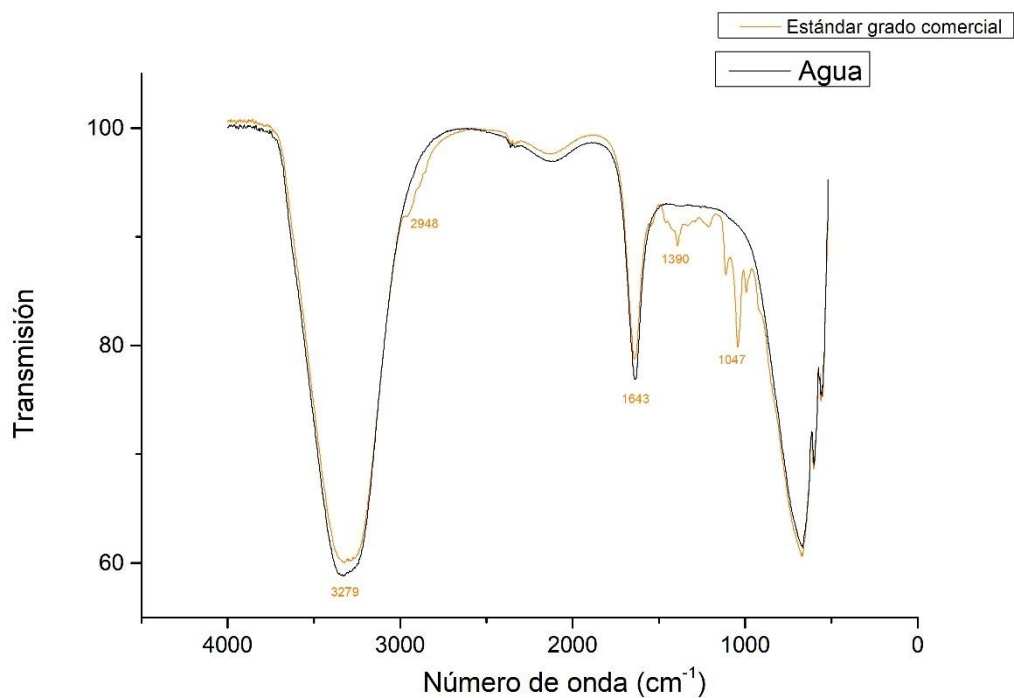


Figura 6. Espectros IR de agua y muestra de grado comercial

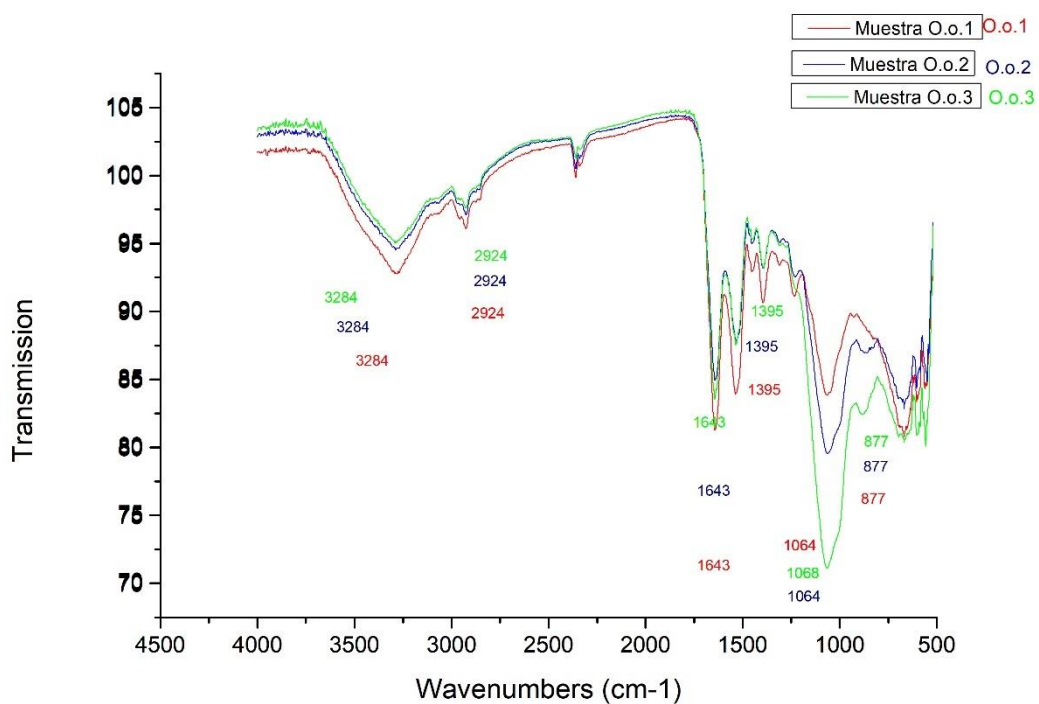
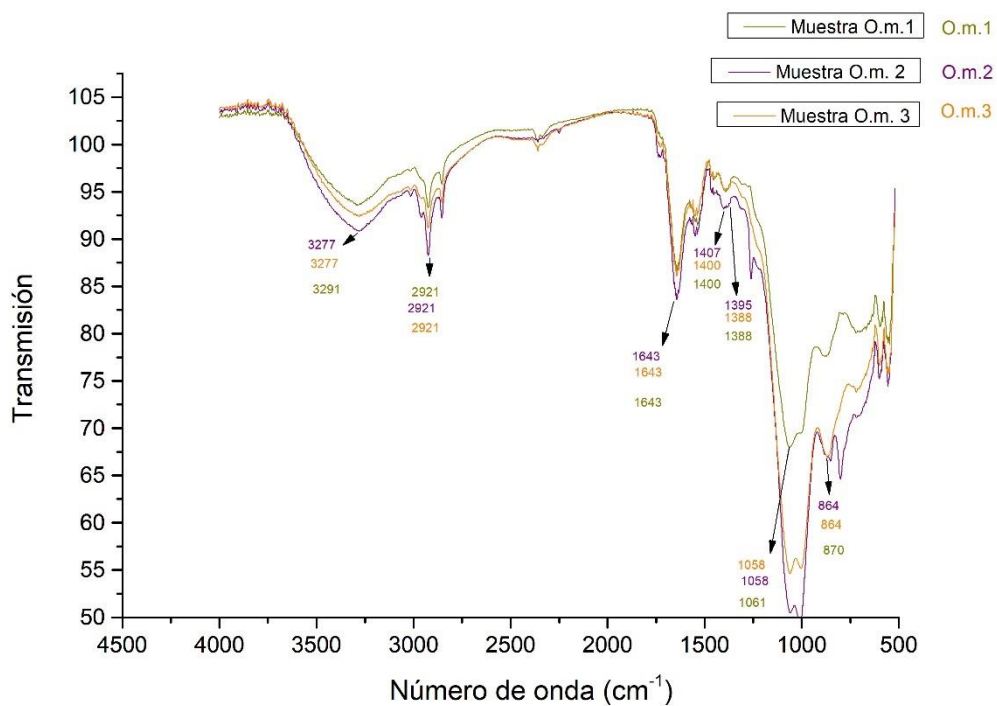
Figura 7. Espectros IR de ácido hialurónico de las muestras O.o. (*O. oculifer*)

Figura 8. Espectros IR de ácido hialurónico de las muestras *O.m.* (*O. mimus*)

Como se puede observar entre las Figuras 7 y 8, se tiene un mismo patrón o muy similar de los espectros IR obtenidos de las muestras de los pulpos ecuatorianos. La muestra comercial, la cual se encontraba diluida, tuvo que compararse directamente con una muestra de agua para la identificación de los picos específicos del ácido hialurónico. Por ello, dentro del espectro de la muestra comercial se pudieron observar 5 picos característicos, los cuales se asemejan a aquellos picos encontrados en la literatura (Maldonado & Rodríguez, 2022):

- Un pico en  $3279\text{ cm}^{-1}$ , el cual corresponde a un estiramiento del enlace del grupo funcional O-H.
- Un pico en  $2946\text{ cm}^{-1}$ , el cual corresponde a un estiramiento del enlace del grupo funcional C-H.
- Un pico en  $1643\text{ cm}^{-1}$ , el cual representa la flexión del enlace del N-H (grupo amida de la molécula).
- Un pico en  $1390\text{ cm}^{-1}$ , e cual corresponde a un estiramiento del enlace del grupo carbonilo (C=O) presente en la amida.
- Un pico en  $1042\text{ cm}^{-1}$ , el cual representa el estiramiento de los enlaces C-O-C presentes en la molécula.

Considerando los espectros de las muestras de ácido hialurónico que se extrajeron a lo largo de este trabajo, se pueden ver la presencia y similitud de los 5 picos característicos de la muestra comercial en la tabla 3.

Tabla 3. Comparativa de los 5 picos de la muestra comercial en los productos obtenidos

Tipos de enlace	Muestra comercial ( $\text{cm}^{-1}$ )	O.o. #1 ( $\text{cm}^{-1}$ )	O.o. #2 ( $\text{cm}^{-1}$ )	O.o. #3 ( $\text{cm}^{-1}$ )	O.m. #1 ( $\text{cm}^{-1}$ )	O.m. #2 ( $\text{cm}^{-1}$ )	O.m. #3 ( $\text{cm}^{-1}$ )
O-H	3279	3284	3284	3284	3291	3277	3277
C-H	2946	2924	2924	2924	2921	2921	2921
N-H	1643	1643	1643	1643	1643	1643	1643
C=O	1390	1395	1395	1395	1388	1395	1388
C-O-C	1042	1064	1064	1068	1061	1058	1058

Además, según Alkrad, Mrestani, Stroehl, Wartewig & Neubert (2003), existen otra diversidad de picos característicos del ácido hialurónico que se obtienen por procesos de extracción o síntesis enzimática. El detalle de los picos se encuentra tabulados en la tabla 4, donde se codificó a las muestras del *Octopus oculifer* como “O.o.” y a las muestras del *Octopus mimus* como “O.m.”

Tabla 4. Comparativa de picos de las muestras de ácido hialurónico extraídas junto a rangos de picos presentes en la literatura

Tipo de enlace	Número de onda del proceso de extracción (cm <sup>-1</sup> )	Número de onda de la literatura (cm <sup>-1</sup> )
C-O-C (estiramiento), O-H (deformación), C=O (deformación)	877 (O.o 1,2,3), 864 (O.m 2,3), 870 (O.m 1) 987 (O.o 1,2,3), 993 (O.m 1,2,3)	896 945 999
C-O-C (estiramiento), C-O (estiramiento), C- O-H (estiramiento)	1064 (O.o 1,2) 1068 (O.o 3) 1058 (O.m 2,3) 1061 (O.m 1)	1038 1079 1155
CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> , C-O-H (deformación), C-O junto a C=O	1395 (O.o 1,2,3- O.m 2) 1388 (O.m 1,3)	1377 1406
NH (deformación)	1536 (O.o 1,2,3) 1542 (O.m 1,2,3)	1468 1563
Amida secundaria	1643 (O.m 1,2,3- pg 1,2,3)	1597 1637
C=O (carboxilamida)	1659 (O.o 1,2,3) 1665 (O.m 1,3) 1655 (O.m 2)	1654 1736
CH (estiramiento)	2924 (O.o 1,2,3) 2921 (O.m 1,2,3)	2853 2925
NH junto a C=O	3086 (O.o 1,2,3) 3015 (O.m 1,2,3)	3105
NH (estiramiento), OH (estiramiento)	3284 (O.o 1,2,3) 3277 (O.m 2,3) 3291 (O.m 1)	3284 3386

Incluso, Kim, Srinivasan, Kim, Choi, Park, Byun, & Lee (2008), constatan la diversidad de rangos relacionados a los grupos funcionales dentro de los espectros

IR del ácido hialurónico, ya que depende en gran medida del grado de pureza y tipo de extracción.

De tal forma, se evidencia una gran similitud de los picos tanto con la muestra comercial como con la literatura por lo que se corrobora la presencia y obtención exitosa del ácido hialurónico.

### 5.3. Análisis proximal

Los estudios realizados detallaron el contenido de humedad, materia orgánica, grasa y proteínas de las muestras de los pulpos *O. oculifer* y *O. mimus*. Mediante dichos análisis se pudo determinar que los pulpos contienen un bajo contenido de grasa y carbohidratos junto con un alto contenido proteico y agua; en donde cada valor respectivo se encuentra detallado desde la tabla 5 hasta la tabla 12.

#### 5.3.1. Humedad

Tabla 5. Porcentaje de humedad en muestras *O.o.* (*O. oculifer*)

Número de muestra	M0 (±0,001g)	M1 (±0,001g)	M2 (±0,001g)	%Humedad
1	54,308	59,360	55,077	84,778
2	54,305	59,677	55,589	76,098
3	38,634	43,907	39,169	89,854
<b>Promedio</b>				<b>83,577</b>

Tabla 6. Porcentaje de humedad en muestras *O.m.* (*O. mimus*)

Número de muestra	M0 (±0,001g)	M1 (±0,001g)	M2 (±0,001g)	Humedad (%)
1	50,480	56,035	51,391	83,600
2	50,482	55,495	51,811	73,489
3	36,907	41,929	37,407	90,044
<b>Promedio</b>				<b>82,378</b>

#### 5.3.2. Cenizas

Tabla 7. Porcentaje de cenizas en muestras *O.o.* (*O. oculifer*)

Número de muestra	C0 (±0,001g)	C1 (±0,001g)	C2 (±0,001g)	Cenizas (%)
-------------------	-----------------	-----------------	-----------------	-------------

1	24,474	29,604	24,673	3,879
2	22,404	28,755	22,669	4,173
3	17,404	23,028	17,605	3,574
<b>Promedio</b>				<b>3,875</b>

Tabla 8. Porcentaje de cenizas en muestras *O.m.* (*O. mimus*)

Número de muestra	C0 ( $\pm 0,001g$ )	C1 ( $\pm 0,001g$ )	C2 ( $\pm 0,001g$ )	Cenizas (%)
1	24,502	30,315	24,746	4,197
2	29,915	35,79	30,235	5,447
3	17,458	22,674	17,511	1,016
<b>Promedio</b>				<b>3,553</b>

### 5.3.3. Grasa

Tabla 9. Porcentaje de grasa en muestras de *O.o.* (*O. oculifer*)

Número de muestra	G0 ( $\pm 0,001g$ )	G1 ( $\pm 0,1g$ )	G2 ( $\pm 0,001g$ )	% de Grasa
1	71,397	10,1	71,441	0,436
2	59,918	10,2	59,949	0,304
3	111,644	10,6	111,789	1,368
<b>Promedio</b>				<b>0,702</b>

Tabla 10. Porcentaje de grasa en muestras *O.m.* (*O. mimus*)

Número de muestra	G0 ( $\pm 0,001g$ )	G1 ( $\pm 0,1g$ )	G2 ( $\pm 0,001g$ )	% de Grasa
1	160,955	10,7	161,035	0,748
2	119,189	10,0	119,22	0,310
3	71,401	10,3	71,488	0,845
<b>Promedio</b>				<b>0,634</b>

Una extracción eficiente de lípidos o grasas dentro de los tejidos animales puede llevarse a cabo por el método de Folch, en donde se utilizan solventes específicos para la disolución de lípidos mientras se desintegran las membranas celulares y lipoproteínas. Específicamente, la mezcla metanol:cloroformo (1:2) cumple dicha función, seguido de un proceso de decantación de la disolución que contiene a los lípidos diluidos y un proceso de separación y purificación de

disoluciones salinas (Saini, Prasad, Shang, & Keum, 2021). Concentramente, para las muestras de pulpo se realizó el método de Folch debido a dichas muestras eran netamente tejido animal.

#### 5.3.4. Proteínas

Tabla 11. Porcentaje de proteínas en muestras *O.o.* (*O. oculifer*)

Número de repeticiones	Blanco (0,1 mL)	Muestra 1 (0,1 mL)	Muestra 2 (0,1 mL)
1	0,5	37,8	37,7
2	0,3	37,5	37,4
3	0,3	37,4	37,4
<b>Promedio</b>	0,4	37,567	37,500
<b>% N total</b>	-	1,773	1,805
<b>% Proteínas</b>	-	11,080	11,279
<b>Promedio proteínas (%)</b>			11,179

Tabla 12. Porcentaje de proteínas en muestras *O.m.* (*O. mimus*)

Número de repeticiones	Blanco (0,1 mL)	Muestra 1 (0,1 mL)	Muestra 2 (0,1 mL)	Muestra 3 (0,1 mL)
1	0,5	37,4	37,8	37,9
2	0,3	37,1	37,9	38,0
3	0,3	37,2	37,9	37,7
<b>Promedio</b>	0,4	37,233	37,867	37,867
<b>% N total</b>	-	1,871	1,965	2,114
<b>% Proteínas</b>	-	11,695	12,281	13,210
<b>Promedio proteínas (%)</b>				12,395

El análisis del contenido proteico se lleva a cabo por el método de Kjeldahl, el cual se divide en 3 etapas primordiales: digestión ácida, destilación y valoración/titulación (García & Fernández, 2012). El proceso de la digestión ácida permite deshacer los enlaces nitrógeno (nitrógeno orgánico) presente dentro de las muestras y convertirlo en iones amonio ( $\text{NH}_4^+$ ). Toda la materia orgánica se descompone en dicha etapa, llegando a obtener una disolución clara como indicativo de la finalización del proceso. Durante el proceso de destilación, los iones amonio reaccionan con una base (NaOH), llegando a formar amoniaco gaseoso. Dichas moléculas entran en contacto con una solución de ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) formando iones de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y el ion borato ( $\text{H}_2\text{BO}_3^-$ ). A la disolución resultante

se le agrega un indicador específico para la posterior titulación ácido-base del ion borato, llegando a su finalización con su viraje de color.

#### 5.3.5. Carbohidratos

La obtención del valor de los carbohidratos se llevó a cabo por medio de una diferencia de todos los resultados anteriormente obtenidos

#### 5.3.6. Composición centesimal

Dentro del Ecuador la pesca de pulpo ha sido considerada una tradición antigua que conlleva una conexión de un contexto socioeconómico. Actualmente, se realiza pescas de dichos animales en las costas de las provincias de Manabí, península de Santa Elena e incluso en Galápagos (Pliego, Flores, Markaida, Barriga, Mora, & Arias, 2016). Son unos de los recursos marinos en auge debido a la demanda actual gracias al agotamiento de poblaciones de peces. Netamente, son valorados como un alimento con alto contenido proteico de muy buena calidad, la cual tiende a variar por la dieta que consumen (Markaida, & Gilly, 2016).

En sí, previos estudios han determinado la composición centesimal del *Octopus mimus*, debido a que es una especie la cual se encuentra en diversas zonas de sur América. Según Bellido, Ordóñez y Plácido (2008), la composición de dicha especie de pulpo se compone de los siguientes valores: Proteína con un 20,72%, Humedad con un 75,33%, Grasa con un 0,36%, Ceniza con un valor de 1,36% y Carbohidratos con un 2,23%. En comparativa con la tabla 13, los valores del *Octopus mimus* tienen una alta correlación en donde se destaca un alto contenido de humedad seguido del contenido proteico en comparativa a los demás componentes.

La variabilidad de dichos datos se debe a la dieta que hayan tenido dichos animales. Según Zúñiga, Olivares & Torres (2011), los pulpos consumen crustáceos, peces y moluscos siendo sus principales fuentes de alimentación. Dependiendo de los factores ambientales de su zona poblacional tendrán un mayor contenido de recursos alimenticios para subsistir conllevando a una variabilidad en su composición centesimal.

Destacando al *Octopus oculifer*, no se tiene estudios previos acerca de composición centesimal debido a que es una especie características de las Islas Galápagos por lo que su exportación solo se centra dentro del territorio ecuatoriano.

Actualmente, es uno de los recursos marinos extraídos en la pesca artesanal de las islas y es comúnmente utilizado para elaboración de platillos (Oviedo, 2015). Aun así, se puede correlacionar los datos de humedad, proteínas, carbohidratos, cenizas y grasa con los valores del *Octopus mimus*, debido a que son cefalópodos pertenecientes al mismo phylum, clase, orden, familia y género. Únicamente varían en su especie. Como se puede observar en la tabla 13, el *Octopus oculifer* posee un alto contenido de humedad, seguido del contenido proteico en comparativa a los demás componentes.

Tabla 13. Composición centesimal de las muestras de pulpo

<b>Análisis</b>	<b><i>Octopus oculifer</i></b>	<b><i>Octopus mimus</i></b>
<b>Humedad</b>	83,577	82,378
<b>Cenizas</b>	3,875	3,553
<b>Grasa</b>	0,702	0,643
<b>Proteínas</b>	11,179	12,395
<b>Carbohidratos</b>	0,667	1,031

## 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El ácido hialurónico es una macromolécula que presenta un alto interés por sus propiedades humectantes y características de elasticidad y biocompatibilidad con la piel de los seres humanos, siendo empleado en el campo de la medicina y de la cosmética. Por lo que, la extracción de dicha molécula involucra un campo de estudio muy amplio debido a que diversas fuentes animales pueden servir como materia prima de partida para la obtención del ácido hialurónico. Entre ellas se destaca a los pulpos, animales compuestos netamente de tejidos conectivos y cartilagosos. De tal forma que, durante el trabajo realizado se logró extraer y aislar el ácido hialurónico presente en estas muestras animales, específicamente las especies *Octopus oculifer* y *Octopus mimus*, con la utilización de una metodología base predispuesta para crestas de gallos. Las muestras de ácido hialurónico presentaron un rendimiento de 3,63 mg/g para el *O. oculifer* y un rendimiento de 0,72 mg/g para el *O. mimus*. Se logró caracterizar las muestras extraídas mediante el uso de la espectroscopía FTIR junto con comparativas de una muestra comercial estándar y resultados de la literatura. Se evidenció que tanto en las muestras extraídas como en la muestra comercial hay la presencia de 5 picos característicos

del ácido hialurónico y de igual forma, se observó una alta similitud de las bandas de los picos detallados en la literatura. Lo cual, confirma la caracterización del ácido hialurónico en las muestras.

La composición centesimal de las dos especies de pulpos dentro del territorio ecuatoriano, indicó que ambas especies poseían un alto contenido de humedad seguido del contenido proteico. Estos resultados presentaron una concordancia adecuada con valores detallados en la literatura del *O. mimus*. Por falta de estudios en base al *O. oculifer*, se realizó la comparativa con datos literarios de su especie compañera, el *O. mimus*.

A pesar de dar un menor contenido de ácido hialurónico en comparativa con las crestas de los gallos se puede considerar a los pulpos como fuentes viables de extracción debido a que se encuentran con valores comparables y superiores a otras fuentes de extracción marina. Por lo cual, se le puede dar un nuevo enfoque a las especies de pulpo presentes en el país.

Una recomendación en base a todo el proceso realizado, radica en la búsqueda de mejoras en la metodología de extracción para optimizar proporciones de los reactivos utilizados para muestras de pulpo en específico.

## 7. REFERENCIAS

- Abatangelo, G., Vindigni, V., Avruscio, G., Pandis, L., & Brun, P. (2020). Hyaluronic acid: redefining its role. *Cells*, 9(7), 1743. Recuperado el 10 de marzo de 2023 de <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/7/1743/htm>
- Abdallah, M. M., Fernandez, N., Matias, A. A., & do Rosario Bronze, M. (2020). Hyaluronic acid and Chondroitin sulfate from marine and terrestrial sources: extraction and purification methods. *Carbohydrate Polymers*, 116441. Doi:10.1016/j.carbpol.2020.116441
- Alessandrello, T., Aquino, G., Duarte, M., & Pereda, L. (2020). Proyecto final de Ingeniería Química Obtención de ácido hialurónico a partir de crestas de gallina. [pdf]
- Alkrad, J., Mrestani, Y., Stroehl, D., Wartewig, S., & Neubert, R. (2003). Characterization of enzymatically digested hyaluronic acid using NMR, Raman, IR, and UV–Vis spectroscopies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 31(3), 545–550. doi:10.1016/s0731-7085(02)00682-9

- AOAC International. (2005). AOAC Official Method 934.01. Recuperado el 17 de marzo de 2023 de <https://silo.tips/download/aoac-official-method-moisture-in-animal-feed>
- AOAC International. (2002). AOAC Official Method 2001.11 Protein (Crude) in Animal Feed, Forage (Plant Tissue), Grain, and Oilseeds Block Digestion Method Using Copper Catalyst and Steam Distillation into Boric Acid. Recuperado el 17 de marzo de 2023 de <https://img.21food.cn/img/biaozhun/20100108/177/11285182.pdf>
- Arévalo, J. (2019). Diseño del bioproceso productivo de ácido hialurónico (Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València). Recuperado el 10 de marzo de 2023 de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/129221/Ar%c3%a9valo%20-%20Dise%c3%b1o%20del%20bioproceso%20productivo%20de%20%c3%a1cido%20hialur%c3%b3nico.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Ayala, A., Hernández, I., & Aguilera, A. (2008). IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE FOLCH PARA LA EXTRACCIÓN DE GRASAS EN FRÍO. Querétaro, México. Recuperado el 17 de marzo de 2023 de <https://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2008/2VeranoIntroduccion/1AyalaTorresHernandez%20Zarazua.pdf>
- Bellido, R., Ordóñez, L. & Plácido, M. (2007). Aplicación del método del índice de calidad en pulpo (*Octopus mimus*).
- Bukhari, S. N. A., Roswandi, N. L., Waqas, M., Habib, H., Hussain, F., Khan, S., Sohali, M., Amlizan, Nor., Ei, H & Hussain, Z. (2018). Hyaluronic acid, a promising skin rejuvenating biomedicine: A review of recent updates and pre-clinical and clinical investigations on cosmetic and nutricosmetic effects. *International Journal of Biological Macromolecules*. Doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.09.188
- Cavalcanti, A., de Melo, B., Ferreira, B., & Santana, M. (2020). Performance of the Main Downstream Operations on Hyaluronic Acid Purification. *Process Biochemistry*. doi:10.1016/j.procbio.2020.08.020
- Cortez, P. (2017). Espectroscopia Infrarroja para todos ... y 51 espectros de alimentos consumidos en México. Recuperado el 09 de abril del 2023 de [https://ciatej.mx/files/divulgacion/divulgacion\\_5a43b7c09fdc1.pdf](https://ciatej.mx/files/divulgacion/divulgacion_5a43b7c09fdc1.pdf)

- Cortez, P. (2020). Capítulo 6. Análisis de los espectros de infrarrojo. *Análisis de los espectros de infrarrojo*. CIATEJ. Recuperado el 09 de abril de 2023 de <https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1023/743>
- García, E., & Fernández, I. (2012). Determinación de proteínas de un alimento por el método Kjeldahl. Valoración con un ácido fuerte. Recuperado el 16 de abril del 2023 de <https://riunet.upv.es/handle/10251/16338>
- Guevara, D., & Sandoval, D. (2021). "Modelado cinético de la producción de ácido hialurónico. Recuperado el 10 de marzo de 2023 de <https://riudg.udg.mx/bitstream/20.500.12104/85268/1/DCUCEI10052.pdf>
- Habuchi, O., Taen, Y., Sato, T., Washino, Y., & Takeuchi, Y. (1983). Grucuronic acid-containing glycopeptide from squid cartilage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 760(2), 318-326.
- Kim, J., Srinivasan, P., Kim, J. H., Choi, J., Park, H. J., Byun, M. W., & Lee, J. W. (2008). Structural and antioxidant properties of gamma irradiated hyaluronic acid. *Food Chemistry*, 109(4), 763–770. doi:10.1016/j.foodchem.2008.01.038
- INEN. (2013). Carne y productos cárnicos. Determinación de cenizas. Recuperado 17 de marzo de 2023 de <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/786.pdf>
- Maldonado, P., & Rodríguez, M. (2022). Obtención de ácido hialurónico mediante *Streptococcus zooepidemicus* empleando como fuente de sustrato residuos de la industria láctea (Bachelor's thesis, Fundación Universidad de América).
- Markaida, U., & Gilly, W. F. (2016). Cephalopods of Pacific Latin America. *Fisheries Research*, 173, 113–121. doi:10.1016/j.fishres.2015.09.014
- Meza, R. (2018). Optimización del método de extracción de ácido hialurónico del humor vítreo de *Oreochromis niloticus*. *Agro Productividad*, 11(6), 128-134. Recuperado el 10 de marzo de 2023 de <https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/443/323>
- Murcia, F. (2005). Pulpo de velos, un extraño cefalópodo. *Eubacteria*, nº 16 (2005). Recuperado el 10 de marzo de 2023 de <https://digitum.um.es/digitum/handle/10201/29167>
- Necas, J., Bartosikova, L., Brauner, P., & Kolar, J. (2008). Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni medicina*, 53(8), 397-411. <https://www.agriculturejournals.cz/pdfs/vet/2008/08/01.pdf>

- Oviedo, M. (2015). Actualización del plan de desarrollo y ordenamiento territorial del catón San Cristóbal 2014-2019. Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal de San Cristóbal Galápagos.
- Pliego, R., Flores, L., Markaida, U., Barriga, I., Mora, E., & Arias, E. (2016). Genetic evidence of the presence of *Octopus mimus* in the artisanal fisheries of octopus in Santa Elena Peninsula, Ecuador. *American Malacological Bulletin*, 34(1), 51–55. doi:10.4003/006.034.0102
- Quezada, D., & Forero, O. (2021). Tequila y sus diferentes aplicaciones en la gastronomía (Bachelor's thesis, Quito). Recuperado el 10 de marzo de 2023 <https://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/11375/1/201557-215056.pdf>
- Sadhasivam, G., Muthuvel, A., Pachaiyappan, A., & Thangavel, B. (2013). Isolation and characterization of hyaluronic acid from the liver of marine stingray *Aetobatus narinari*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 54, 84-89. Doi:10.1016/j.ijbiomac.2012.11.028
- Saini, R., Prasad, P., Shang, X., & Keum, Y. (2021). Advances in lipid extraction methods—a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24), 13643. Recuperado el 16 de abril del 2023 de <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/24/13643>
- Sauer, W., Gleadall, I., Downey, N., Doubleday, Z., Gillespie, G., Haimovici, M., ... & Pecl, G. (2021). World octopus fisheries. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 29(3), 279-429. <https://doi.org/10.1080/23308249.2019.1680603>
- Simbaña, M. (2017). PESQUERÍA A PULMÓN DEL PULPO *Octopus mimus* (GOULD 1852) EN LA PLAYA DE CHIPIPE, SALINAS. Tesis. Recuperado el 10 de marzo de 2023 de <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/15111>
- Wang, J., Jiang, N., Cai, Z., Li, W., Li, J., Lin, X., Zenghong, X., Lijun, Y., & Zhang, Q. (2017). Sodium hyaluronate-functionalized urea-formaldehyde monolithic column for hydrophilic in-tube solid-phase microextraction of melamine. *Journal of Chromatography A*, 1515, 54–61. doi:10.1016/j.chroma.2017.08.005
- Zamora, M., & Olivares, A. (2004). Variaciones bioquímicas e histológicas asociadas al evento reproductivo de la hembra de *Octopus mimus* (Mollusca: Cephalopoda). *International Journal of Morphology*, 22(3), 207-216. Recuperado el 10 de marzo de 2023 de

[https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-95022004000300006](https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022004000300006)

Zúñiga, O., Olivares, A., & Torres, I. (2011). Evaluación del crecimiento del pulpo común *Octopus mimus* del norte de Chile alimentado con dietas formuladas. *Latin american journal of aquatic research*, 39(3), 584-592.

## 8. ANEXOS

8.1. Cálculo de masas de reactivos para el proceso de lavado

8.1.1. Cloroformo

Por cada kilogramo de muestra se requiere 1L de cloroformo

Densidad de cloroformo: 1,49 kg/L

○ O.o. #1

$$x = \frac{0,1001kg * 1L}{1kg}$$

$$x = 0,1001L$$

$$m = 1,49 \frac{kg}{L} * 0,1001L$$

$$m = 0,1492kg * \frac{1000g}{1kg} = 149,2g$$

○ O.o. #2

$$x = \frac{0,1003kg * 1L}{1kg}$$

$$x = 0,1003L$$

$$m = 1,49 \frac{kg}{L} * 0,1003L$$

$$m = 0,1494kg * \frac{1000g}{1kg} = 149,4g$$

○ O.o. #3

$$x = \frac{0,1006kg * 1L}{1kg}$$

$$x = 0,1006L$$

$$m = 1,49 \frac{kg}{L} * 0,1006L$$

$$m = 0,1499kg * \frac{1000g}{1kg} = 149,9g$$

- O.m. #1

$$x = \frac{0,1008kg * 1L}{1kg}$$

$$x = 0,1008L$$

$$m = 1,49 \frac{kg}{L} * 0,1008L$$

$$m = 0,1502kg * \frac{1000g}{1kg} = 150,2g$$

- O.m. #2

$$x = \frac{0,1005kg * 1L}{1kg}$$

$$x = 0,1005L$$

$$m = 1,49 \frac{kg}{L} * 0,1005L$$

$$m = 0,1497kg * \frac{1000g}{1kg} = 149,7g$$

- O.m. #3

$$x = \frac{0,1003kg * 1L}{1kg}$$

$$x = 0,1003L$$

$$m = 1,49 \frac{kg}{L} * 0,1003L$$

$$m = 0,1494kg * \frac{1000g}{1kg} = 149,4g$$

### 8.1.2. Acetona

Por cada kilogramo de muestra se requiere 1 kilogramo de acetona

- O.o. #1

$$x = 0,1001 \text{ kg de muestra}$$

$$m = 0,1001 \text{ kg} * \frac{1000g}{1kg} = 100,1 \text{ g de acetona}$$

- O.o. #2

$$x = 0,1003 \text{ kg de muestra}$$

$$m = 0,1003 \text{ kg} * \frac{1000g}{1kg} = 100,3 \text{ g de acetona}$$

- O.o. #3

$$x = 0,1006 \text{ kg de muestra}$$

$$m = 0,1006 \text{ kg} * \frac{1000g}{1kg} = 100,6 \text{ g de acetona}$$

- O.m. #1

$$x = 0,1008 \text{ kg de muestra}$$

$$m = 0,1008 \text{ kg} * \frac{1000g}{1kg} = 100,8 \text{ g de acetona}$$

- O.m. #2

$$x = 0,1005 \text{ kg de muestra}$$

$$m = 0,1005 \text{ kg} * \frac{1000g}{1kg} = 100,5 \text{ g de acetona}$$

- O.m. #3

$$x = 0,1003 \text{ kg de muestra}$$

$$m = 0,1003 \text{ kg} * \frac{1000g}{1kg} = 100,3 \text{ g de acetona}$$

### 8.1.3. Acetato de sodio

Por cada kilogramo de muestra se requiere 0,05kg de acetato de sodio

- O.o. #1

$$x = \frac{0,1001 \text{ kg de muestra} * 0,05\text{kg de acetato de sodio}}{1\text{kg de muestra}}$$

$$x = 0,005kg * \frac{1000g}{1kg} = 5g$$

- O.o. #2

$$x = \frac{0,1003 \text{ kg de muestra} * 0,05\text{kg de acetato de sodio}}{1\text{kg de muestra}}$$

$$x = 0,005kg * \frac{1000g}{1kg} = 5g$$

- O.o. #3

$$x = \frac{0,1006 \text{ kg de muestra} * 0,05\text{kg de acetato de sodio}}{1\text{kg de muestra}}$$

$$x = 0,005kg * \frac{1000g}{1kg} = 5g$$

- O.m. #1

$$x = \frac{0,1008 \text{ kg de muestra} * 0,05\text{kg de acetato de sodio}}{1\text{kg de muestra}}$$

$$x = 0,005kg * \frac{1000g}{1kg} = 5g$$

- O.m. #2

$$x = \frac{0,1005 \text{ kg de muestra} * 0,05\text{kg de acetato de sodio}}{1\text{kg de muestra}}$$

$$x = 0,005kg * \frac{1000g}{1kg} = 5g$$

- O.m. #3

$$x = \frac{0,1003 \text{ kg de muestra} * 0,05\text{kg de acetato de sodio}}{1\text{kg de muestra}}$$

$$x = 0,005kg * \frac{1000g}{1kg} = 5g$$

#### 8.1.4. Formaldehido

Por cada kilogramo de muestra se requiere 0,1kg de formaldehido

- O.o. #1

$$x = \frac{0,1001 \text{ kg de muestra} * 0,1\text{kg de formaldehido}}{1\text{kg de muestra}}$$

$$x = 0,01001\text{kg de formaldehido} * \frac{1000\text{g}}{1\text{kg}} = 10,01 \text{ g de formaldehido}$$

- O.o. #2

$$x = \frac{0,1003 \text{ kg de muestra} * 0,1\text{kg de formaldehido}}{1\text{kg de muestra}}$$

$$x = 0,01003\text{kg de formaldehido} * \frac{1000\text{g}}{1\text{kg}} = 10,03 \text{ g de formaldehido}$$

- O.o. #3

$$x = \frac{0,1006 \text{ kg de muestra} * 0,1\text{kg de formaldehido}}{1\text{kg de muestra}}$$

$$x = 0,01006\text{kg de formaldehido} * \frac{1000\text{g}}{1\text{kg}} = 10,06 \text{ g de formaldehido}$$

- O.m. #1

$$x = \frac{0,1008 \text{ kg de muestra} * 0,1\text{kg de formaldehido}}{1\text{kg de muestra}}$$

$$x = 0,01008\text{kg de formaldehido} * \frac{1000\text{g}}{1\text{kg}} = 10,08 \text{ g de formaldehido}$$

- O.m. #2

$$x = \frac{0,1005 \text{ kg de muestra} * 0,1\text{kg de formaldehido}}{1\text{kg de muestra}}$$

$$x = 0,01005\text{kg de formaldehido} * \frac{1000\text{g}}{1\text{kg}} = 10,05 \text{ g de formaldehido}$$

- O.m. #3

$$x = \frac{0,1003 \text{ kg de muestra} * 0,1\text{kg de formaldehido}}{1\text{kg de muestra}}$$

$$x = 0,01003 \text{ kg de formaldehido} * \frac{1000 \text{ g}}{1 \text{ kg}} = 10,03 \text{ g de formaldehido}$$

### 8.1.5. Precipitación con acetona

Por cada kg de disolución a precipitar se requiere 2 L de acetona

$$\text{Densidad de acetona: } 784 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3} * \frac{1 \text{ m}^3}{1000 \text{ L}} = 0,784 \frac{\text{kg}}{\text{L}}$$

- O.o. #1

$$x = \frac{0,1056 \text{ kg de disolución} * 2 \text{ L acetona}}{1 \text{ kg de disolución}}$$

$$x = 0,2112 \text{ L} * \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = 211,2 \text{ mL}$$

$$m = 0,784 \frac{\text{kg}}{\text{L}} * 0,2112 \text{ L} = 0,1656 \text{ kg} * \frac{1000 \text{ g}}{1 \text{ kg}} = 165,6 \text{ g de acetona}$$

- O.o. #2

$$x = \frac{0,1204 \text{ kg de disolución} * 2 \text{ L acetona}}{1 \text{ kg de disolución}}$$

$$x = 0,2408 \text{ L} * \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = 240,8 \text{ mL}$$

$$m = 0,784 \frac{\text{kg}}{\text{L}} * 0,2408 \text{ L} = 0,1888 \text{ kg} * \frac{1000 \text{ g}}{1 \text{ kg}} = 188,8 \text{ g de acetona}$$

- O.o. #3

$$x = \frac{0,1351 \text{ kg de disolución} * 2 \text{ L acetona}}{1 \text{ kg de disolución}}$$

$$x = 0,2702 \text{ L} * \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = 270,2 \text{ mL}$$

$$m = 0,784 \frac{\text{kg}}{\text{L}} * 0,2702 \text{ L} = 0,2118 \text{ kg} * \frac{1000 \text{ g}}{1 \text{ kg}} = 211,8 \text{ g de acetona}$$

- O.m. #1

$$x = \frac{0,1532 \text{ kg de disolución} * 2 \text{ L acetona}}{1 \text{ kg de disolución}}$$

$$x = 0,3064 L * \frac{1000mL}{1L} = 306,4 mL$$

$$m = 0,784 \frac{kg}{L} * 0,3064L = 0,2402g * \frac{1000g}{1kg} = 240,2 g \text{ de acetona}$$

○ O.m. #2

$$x = \frac{0,151,6 kg \text{ de disolución} * 2L \text{ acetona}}{1 kg \text{ de disolución}}$$

$$x = 0,3032 L * \frac{1000mL}{1L} = 303,2 mL$$

$$m = 0,784 \frac{kg}{L} * 0,3032L = 0,2377kg * \frac{1000g}{1kg} = 237,7 g \text{ de acetona}$$

○ O.m. #3

$$x = \frac{0,1540 kg \text{ de disolución} * 2L \text{ acetona}}{1 kg \text{ de disolución}}$$

$$x = 0,3080 L * \frac{1000mL}{1L} = 308,0 mL$$

$$m = 0,784 \frac{kg}{L} * 0,3080L = 0,2415kg * \frac{1000g}{1kg} = 241,5 g \text{ de acetona}$$

Tabla 14. Masa de cloroformo necesario para el *Octopus oculifer*

Número de muestra	Muestra de pulpo ( $\pm 0,1g$ )	Cloroformo ( $\pm 0,1g$ )	Vaso de precipitación ( $\pm 0,1g$ )
1	100,1	149,3	136,5
2	100,3	149,4	135,7
3	100,6	149,9	139,2

Tabla 15. Masa de cloroformo necesario para el *Octopus mimus*

Número de muestra	Muestra de pulpo ( $\pm 0,1g$ )	Cloroformo ( $\pm 0,1g$ )	Vaso de precipitación ( $\pm 0,1g$ )
1	100,8	151,5	144,5
2	100,5	149,8	122,2
3	100,3	149,2	144,2

Tabla 16. Masa de acetona, acetato de sodio y formaldehído necesario para el *Octopus oculifer*

Número de muestra	Pulpo ( $\pm 0,1g$ )	Acetona ( $\pm 0,1g$ )	Acetato de sodio ( $\pm 0,1g$ )	Formaldehído ( $\pm 0,1g$ )
1	100,1	100,1	5,1	10,0
2	100,3	100,6	5,2	10,1
3	100,6	100,7	5,1	10,1

Tabla 17. Masa de acetona, acetato de sodio y formaldehído necesario para el *Octopus mimus*

Número de muestra	Pulpo ( $\pm 0,1g$ )	Acetona ( $\pm 0,1g$ )	Acetato de sodio ( $\pm 0,1g$ )	Formaldehído ( $\pm 0,1g$ )
1	100,8	101,6	5,1	10,0
2	100,5	101,1	5,2	10,3
3	100,3	100,7	5,2	10,0

Tabla 18. Volumen de agua necesaria para la masa del *Octopus oculifer*

Número de muestra	Pulpo triturado ( $\pm 0,1g$ )	Volumen de agua a pH 10,42 ( $\pm 1$ mL)
1	104,2	225
2	98,0	225
3	93,0	225

Tabla 19. Volumen de agua necesaria para la masa del *Octopus mimus*

Número de muestra	Pulpo triturado ( $\pm 0,1g$ )	Volumen de agua a pH 10,34 ( $\pm 1$ mL)
1	80,0	225
2	83,3	225
3	85,1	225

Tabla 20. Valores de acetona requeridos para generar precipitación en muestras *Octopus oculifer*

Número de muestra	Líquido ( $\pm 0,1g$ )	Peso de acetona ( $\pm 0,1g$ )
1	105,6	166,2

2	120,4	188,7
3	135,1	211,9

Tabla 21. Valores de acetona requeridos para generar precipitación en muestras *Octopus mimus*

Número de muestra	Líquido ( $\pm 0,1$ g)	Peso de acetona ( $\pm 0,1$ g)
1	153,2	240,0
2	151,6	237,8
3	154,0	241,7

Tabla 22. Factor de corrección del HCl

$\text{Na}_2\text{CO}_3$ ( $\pm 0,01$ g)	Uso de HCl ( $\pm 0,1$ mL)	Fc
0,05	11,5	0,820
0,05	11,7	0,806
0,05	11,8	0,800
<b>Promedio</b>		0,809

## 8.2. Figuras del proceso



Figura 9. Pesaje inicial de O.o. (*O. oculifer*) muestra #1

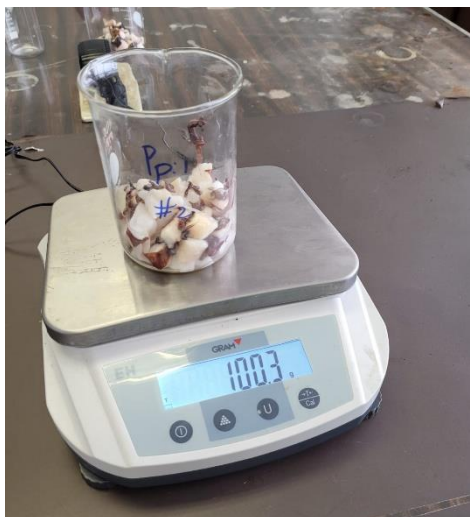


Figura 10. Pesaje inicial de O.o. (*O. oculifer*) muestra #2



Figura 11. Pesaje inicial de O.o. (*O. oculifer*) muestra #3



Figura 12. Lavados con cloroformo de las muestras O.o. (*O. oculifer*)

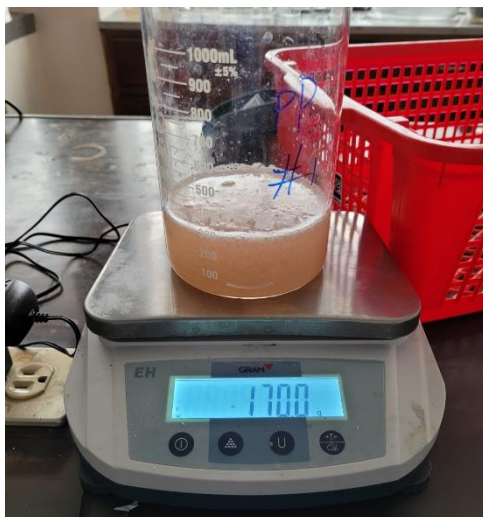


Figura 13. Disolución a pH alcalino de la muestra #1 O.o. (*O. oculifer*)

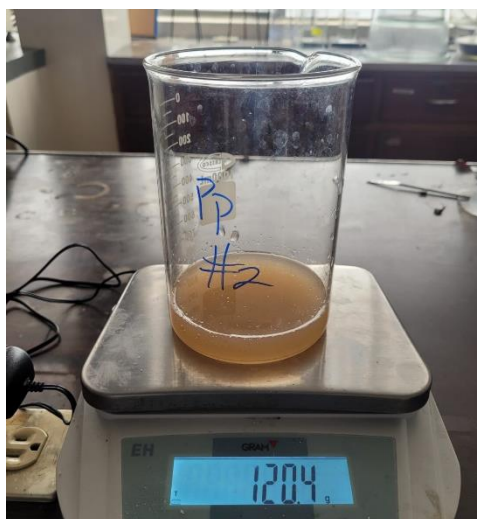


Figura 14. Disolución a pH alcalino de la muestra #2 O.o. (*O. oculifer*)



Figura 15. Disolución a pH alcalino de la muestra #3 *O.o.* (*O. oculifer*)



Figura 16. Pesaje inicial *O.m.* (*O. mimus*) muestra #1

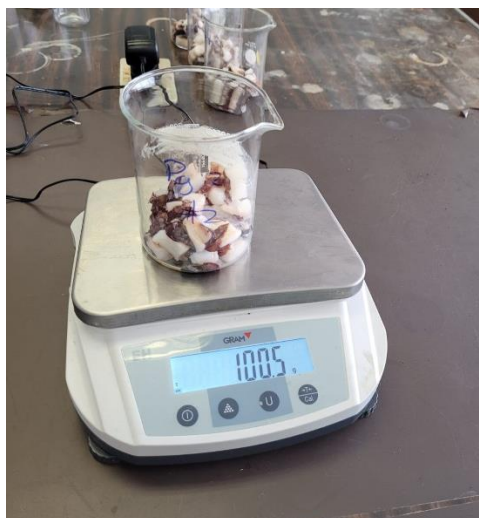


Figura 17. Pesaje inicial *O.m.* (*O. mimus*) muestra #2



Figura 18. Pesaje inicial *O.m.* (*O. mimus*) muestra #3



Figura 19. Lavados de cloroformo de las muestras *O.m.* (*O. mimus*)

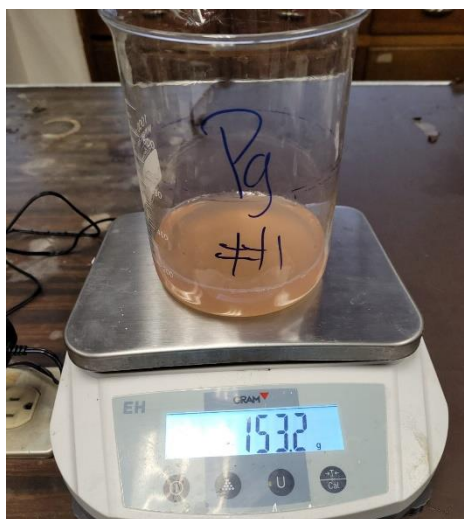


Figura 20. Disolución a pH alcalino de la muestra #1 *O.m.* (*O. mimus*)

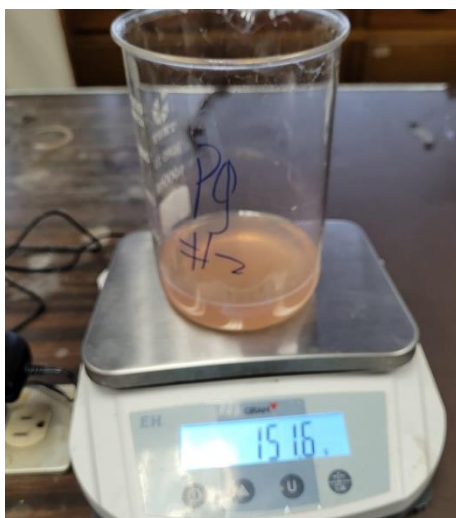


Figura 21. Disolución a pH alcalino de la muestra #2 *O.m.* (*O. mimus*)

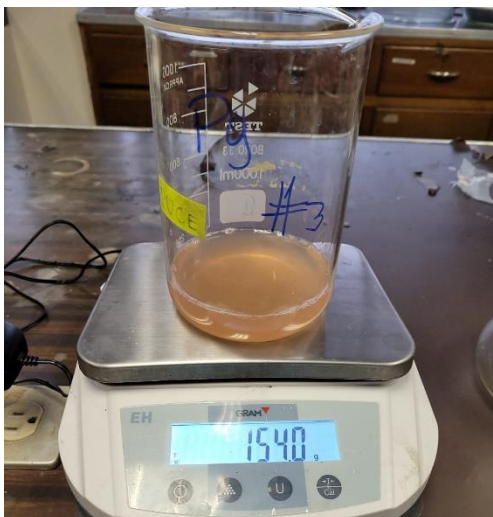


Figura 22. Disolución a pH alcalino de la muestra #3 *O.m.* (*O. mimus*)

### 8.3. Figuras del análisis proximal



Figura 23. Homogenización de muestras



Figura 24. Muestra de pulpo homogenizada



Figura 25. Muestra de pulpo después del proceso de humedad

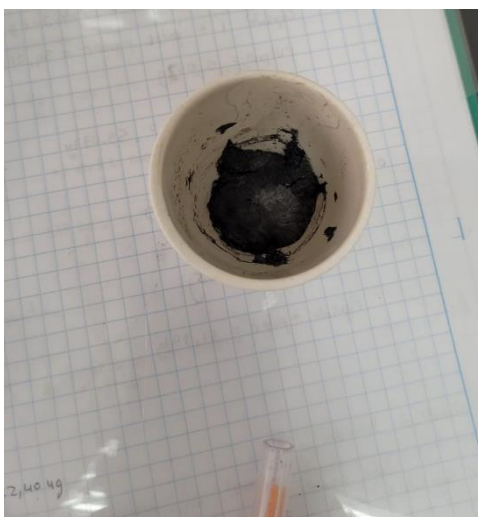


Figura 26. Muestra de pulpo después del proceso de cenizas

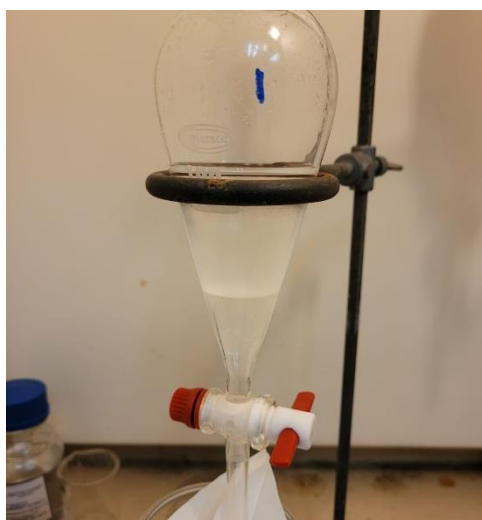


Figura 27. Extracción de grasa por el método de Folch



Figura 28. Digestión ácida a muestra de pulpo



Figura 29. Destilación a disolución ácida de pulpo



Figura 30. Titulación para obtención del valor de proteínas

#### 8.4. Espectros IR individuales

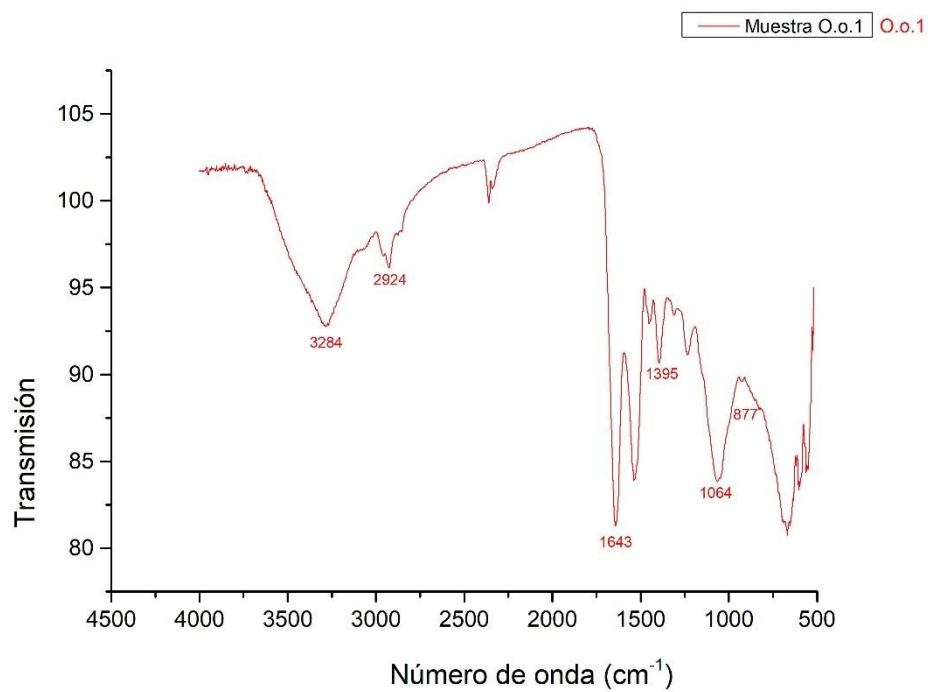


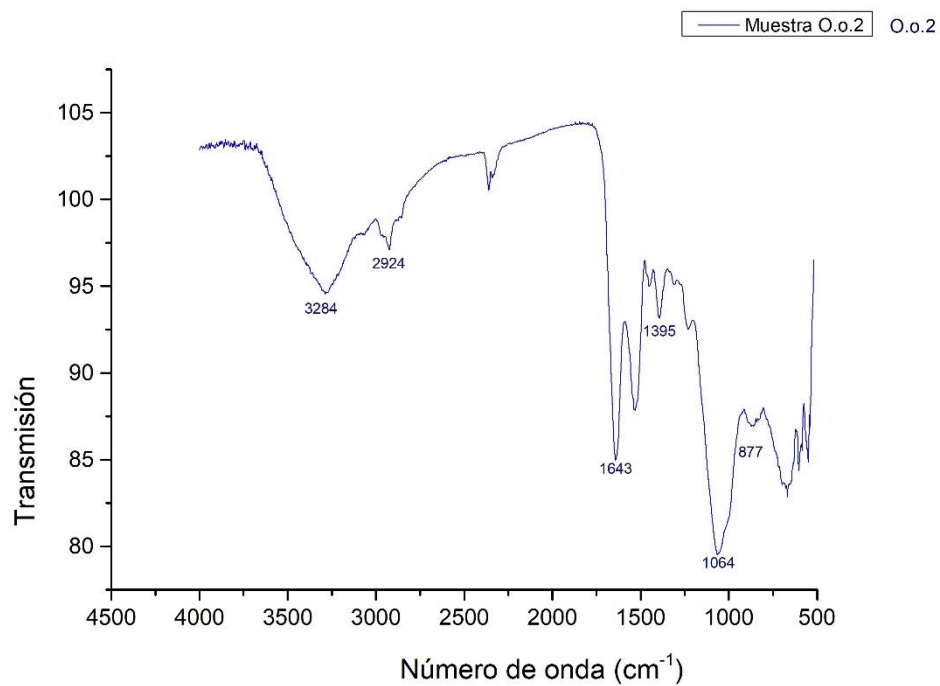
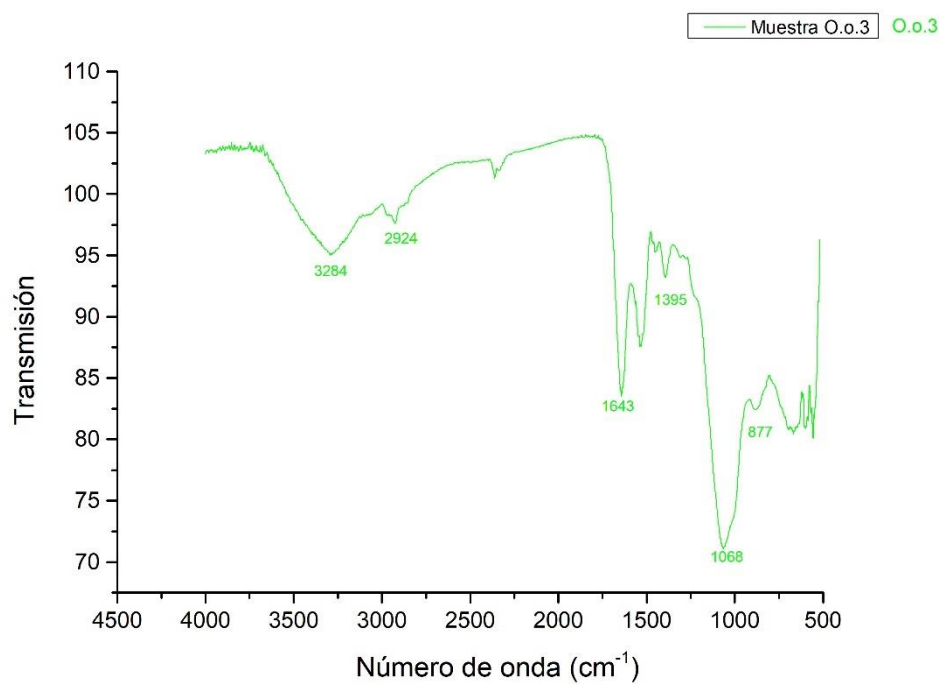
Figura 31. Espectro IR de muestra O.o. (*O. oculifer*) #1Figura 32. Espectro IR de muestra O.o. (*O. oculifer*) #2

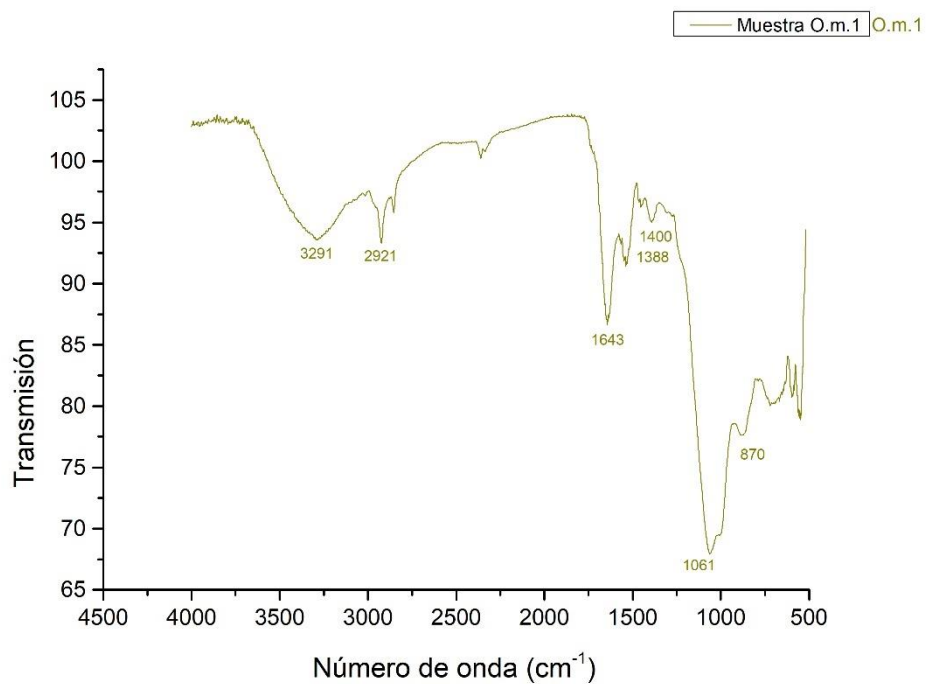
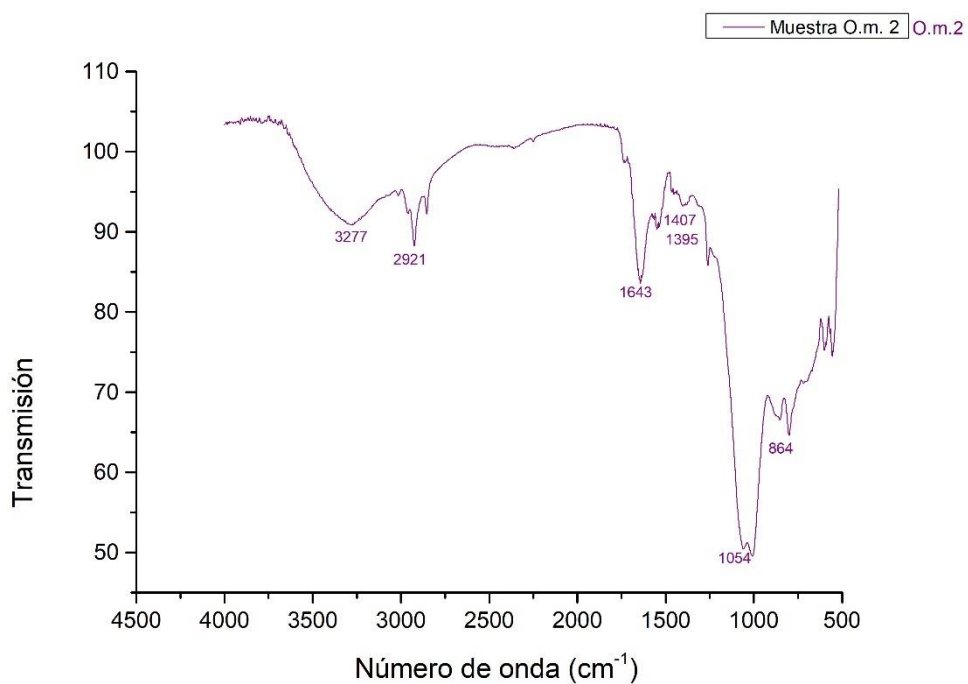
Figura 33. Espectro IR de muestra *O.o.* (*O. oculifer*) #3Figura 34. Espectro IR de muestra *O.m.* (*O. mimus*) #1

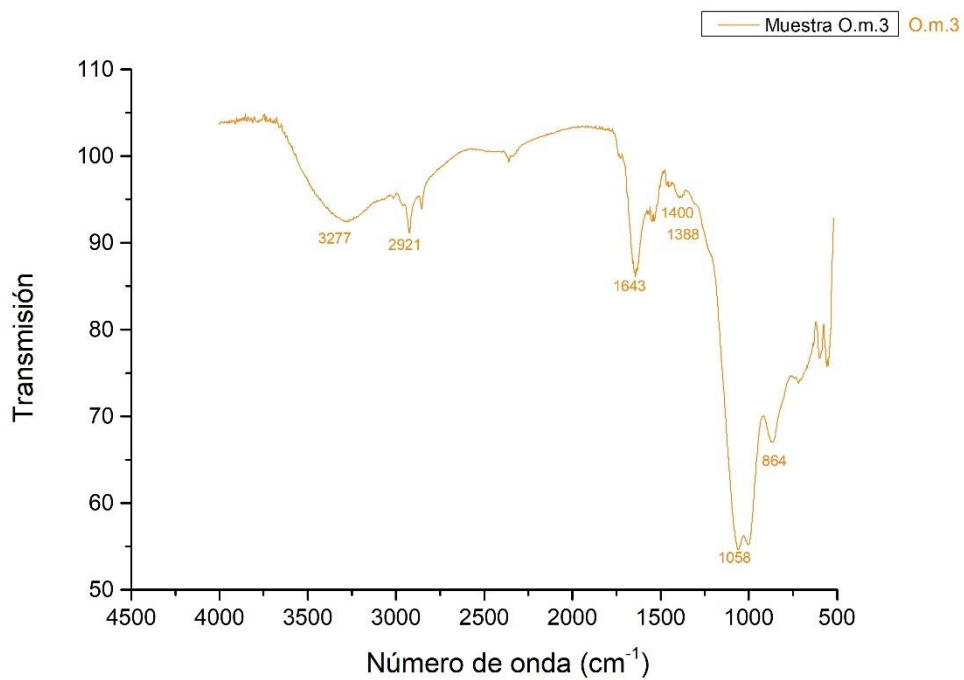
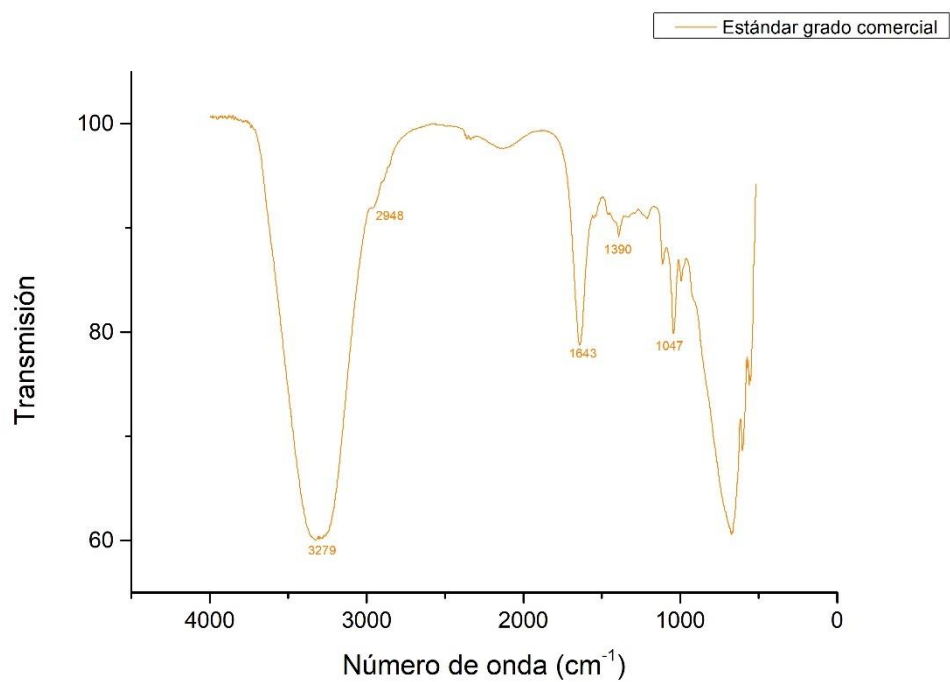
Figura 35. Espectro IR de muestra *O.m.* (*O. mimus*) #2Figura 36. Espectro IR de muestra *O.m.* (*O. mimus*) #3

Figura 37. Espectro IR de muestra de grado comercial

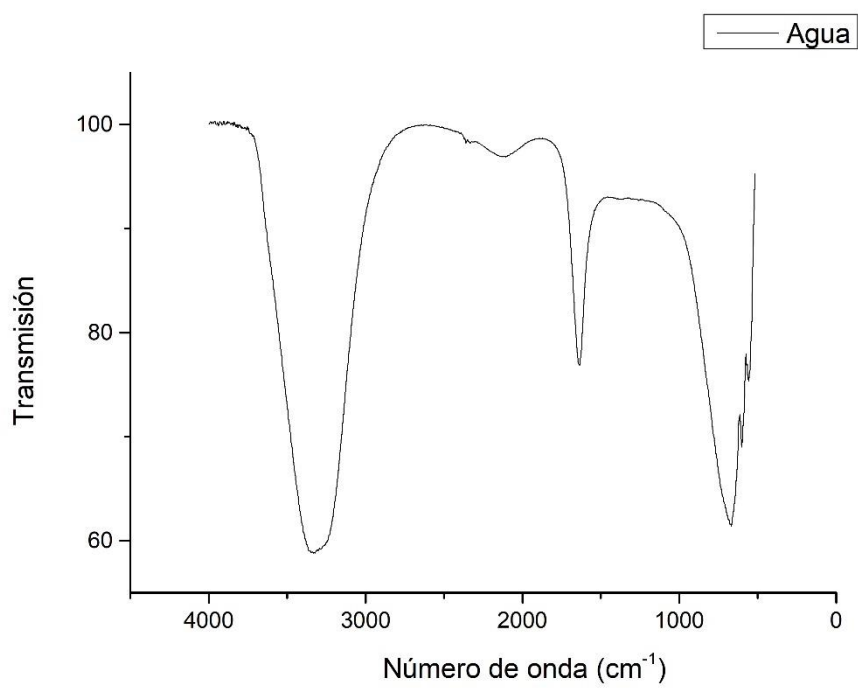


Figura 38. Espectro IR del agua