



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

Actividad hipocolesterolémica del
quitosán extraído de langosta
(*Panulirus interruptus*).



TESIS

que para obtener el título de

OCEANOLOGO

presenta

SILVIA CRUZ BAILON

Ensenada, B.C., Agosto de 1994

INDICE

	Pág.
Resumen	i
Aprobación	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimiento.....	iv
Lista de tablas y Figuras	v
Introducción	1
Antecedentes.....	4
Objetivo.....	7
Metodología	8
Resultados	19
Discusión	29
Conclusiones	35
Literatura citada	36
Anexo I.....	40
Anexo II	49

RESUMEN

Se investigó el efecto hipocolesterolémico del quitosán extraído del caparazón de langosta (*Panulirus interruptus*) en ratas de la raza Sprague-Dawley, administrado por vía oral durante 21 días a un grupo de 6 ratas; tres grupos restantes fueron alimentados con diferentes dietas, las cuales fueron: una dieta carente de colesterol, una dieta rica en colesterol y una dieta con un hipocolesterolémico comercial (Questran). Los resultados obtenidos demostraron que el quitosán a un nivel del 2% posee un efecto hipocolesterolémico al disminuir las concentraciones de colesterol en el hígado, no así en sangre. Por otra parte se encontró que el efecto hipocolesterolémico del quitosán y el questran es semejante, lo que supone que el quitosán trabaja en el organismo de la misma forma que el questran.

Actividad hipocolesterolémica del quitosán extraído de langosta
(*panulirus interruptus*)

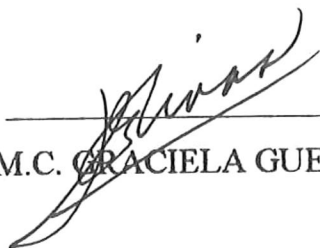
TESIS

que presenta

Silvia Cruz Bailón

Aprobada por

Presidente del Jurado


M.C. GRACIELA GUERRA RIVAS

Sinodal

Sinodal


M.C. JUAN A. FERNANDEZ AFANGO


OC. CONAL DAVID TRUE

El presente trabajo se llevó a cabo dentro del proyecto "Aprovechamiento del Potencial Farmacológico de Especies Marinas de las Costas de Baja California" gracias al apoyo de la Dirección General de Investigación Científica y Superación Académica de la Secretaría de Educación Pública por medio del convenio # 8434.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi mamá y a mi papá, porque sin su apoyo, no estaría donde estoy y no sería lo que soy.

Y a mis hermanos, porque siempre me han recibido con los brazos abiertos y porque siempre he recibido lo mejor de cada uno de ellos.

GRACIAS.

AGRADECIMIENTOS

A la M.C. Graciela Guerra Rivas por su apoyo, ayuda y por todo lo que como ser humano, nos puede ofrecer.

GRACIAS

A Ana María Iñiguez Mtz. por su ayuda, confianza y entusiasmo.

A la Arq. Yolanda García por su calidad humana.

A mi amiga C. Marissa Calderón Torres por los buenos tiempos y por que vengan mejores. Gracias también a su familia por su amistad.

A la Oc. Rosa María Plascencia, al M.C. Faustino Camarena Rosales y al Biol. Jorge Alaníz García.

A mis amigas Marina, Griselda e Ignacia por entender.

A la compañera Zandra Carrillo porque en los mejores y también en los peores momentos del bioensayo contaba con ella.

A mis sinodales M.C. Juan A. Fernández Apango y al Oc. Conal David True por sus comentarios y su disponibilidad.

GRACIAS.

A Eduardo de Neira Arias

A la Oc. Ma. Victoria Orozco B.

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

	Pág.
Tabla I.- Constituyentes básicos de las dietas basal, questran, quitosán y colesterol en base a Sugano (1980), proporcionadas a los animales de experimentación "ad libitum" durante la realización del bioensayo.....	13
Tabla II.- Constituyentes de mezcla de vitaminas y minerales (Harper, 1958), adicionadas a las dietas y suministradas a los organismos de prueba a lo largo del bioensayo.....	14
Tabla III.- Valores de viscosidad específica entre la concentración en función de la concentración para cada uno de los lotes de quitosán y su correspondiente ecuación de la recta, donde se muestran los valores de viscosidad intrínseca (ordenada al origen).....	20
Tabla IV.- Rendimiento y propiedades fisicoquímicas del quitosán obtenido a partir de caparazón de langosta (<i>Panulirus interruptus</i>) por el método de Hackman (1954) y Broussignac (1968), modificado por Castillo-Rosales (1991).....	21
Tabla V.- Valores de peso inicial y peso ganado por cada animal de experimentación, durante el bioensayo.....	22
Tabla VI.- Resultados del estadístico Kolmogorov-Smirnov (a un nivel de significancia de 0.05), para los valores de peso ganado.....	23
Tabla VII.- Resultados del estadístico "t" Student (comparación entre medias a un nivel de significancia de 0.05), para los valores de peso ganado.....	25
Tabla VIII.- Valores correspondientes a concentraciones de colesterol en la sangre e hígado de cada individuo.....	26
Tabla IX.- Resultados del estadístico Kolmogorov-Smirnov (a un nivel de significancia de 0.05) para los valores de concentración de colesterol en sangre e hígado.....	27
Tabla X.- Resultados del estadístico "t" Student (comparación entre medias a un nivel de significancia de 0.05), para los valores de concentración de colesterol en sangre e hígado.....	28
Tabla I.- ANEXO II. Pesos de los hígados correspondientes a cada organismo de prueba.....	50

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

	Pág.
Figura 1.- Diagrama de flujo para la obtención y estudio del quitosán, método modificado de Hackman (1954) y Broussignac (1968) a partir del caparazón de langosta (<i>Panulirus interruptus</i>) (Modificado por Castillo-Rosales, 1991).	9
Figura 2.- Diagrama de flujo para la realización del bioensayo en ratas (Sprague-Dawley) para la evaluación del efecto hipocolesterolémico del quitosán extraído de langosta (<i>Panulirus interruptus</i>).	16
Figura 1.- ANEXO I. Evolución del peso (g.) de cada animal de experimentación durante el tiempo de acondicionamiento y desarrollo del bioensayo.	41
Figura 1.- ANEXO II. Gráficas de viscosidad específica entre la concentración en función de la concentración para cada uno de los lotes de quitosán y su correspondiente ecuación de la recta, donde se muestran los valores de viscosidad intrínseca (ordenada al origen).	51

INTRODUCCION.

Actualmente existen muchos polisacáridos naturales disponibles comercialmente. Entre éstos, se incluyen la celulosa, dextranos, pectina, ácido algínico, agar-agar, agarosa, almidón, carragenanos y heparina; todos son de naturaleza neutra o ácida (Muzzarelli, 1977). Otros polisacáridos como la quitina y sus derivados han sido poco utilizados comercialmente, a pesar de que se han estudiado durante años y se conocen muchas de sus propiedades químicas (Ashford, et al., 1977). La quitina es aceptada generalmente como un polímero lineal de unidades de 2-acetilamino-D-Glucosa. El quitosán es más fácil de definir químicamente, ya que pertenece a la familia de polímeros derivados de la quitina; se obtiene por medio de la desacetilación de la quitina y de la misma dependen sus propiedades fisicoquímicas (Filar y Wirick, 1977). La quitina es un polisacárido natural componente del caparazón de artrópodos, anélidos, moluscos y celenterados, después de la celulosa es el segundo polímero más abundante en la naturaleza (Sandford, 1988). La quitina es un recurso abundante; esto es una razón para explotarla, porque no sólo la quitina, sino también el quitosán poseen un amplio espectro de propiedades funcionales (Rha, 1984).

Las principales aplicaciones de la quitina son: como un acelerador para la cicatrización, en la preparación de fibras absorbentes para suturas, telas, componentes para forraje, fertilizante y como vibrador para sistemas de audio, entre otras aplicaciones (Hirano, 1988). Sin embargo, la variabilidad en las características de la quitina en función del método de extracción es tan grande (Brine y Austin, 1981, citados por Castillo-Rosales, 1991), que algunos autores sostienen que la quitina no es una entidad química, sino un producto que se define por su fuente y método de aislamiento (Rutherford y Austin, citados por Castillo-Rosales, 1991). Por lo tanto, a cada fuente potencial de quitina debe aplicarse un método particular y con condiciones de extracción bien definidas; es decir, un método estandarizado que pueda ser aplicable y económicamente viable para su producción comercial (Johnson y Peniston, 1982).

El desarrollo comercial de industrias de la quitina y el quitosán no ha sido apreciable, pero al parecer la gran demanda por estos productos y la presión por encontrar una solución práctica para los problemas de desechos de mariscos, podría resultar en una actividad altamente productiva (Johnson y Peniston, 1982).

Las industrias procesadoras de mariscos concentran en áreas definidas los desperdicios que se acumulan durante la noche, esto tiende a ser de gran provecho para la producción de quitina y quitosán; ya que usualmente los residuos se comercializan a un bajo costo como alimento para animales de corral y se utilizan tan sólo como fertilizantes (Perceval, 1977). La producción comercial de quitina es estimada en aproximadamente 150,000 toneladas por año, provenientes de fuentes comerciales como son: cangrejos, camarones, langostas, krill y calamares (Allan y Berkeley, citados por Rha, 1984).

México cuenta con recursos como son el camarón y la langosta, cuya captura anual, tan sólo en Baja California para 1993 fue de 207,913 ton. para la langosta y de 460,445 ton. para el camarón, por lo que tiene potencial para elaborar productos de alto valor agregado (Secretaría de Pesca. Delegación Federal de Pesca en el Edo. de B.C., 1993). Pero a pesar de las ventajas económicas que se derivan de la pesca y exportación del camarón y la langosta, hay un reglón lamentablemente desaprovechado. Cada año se arrojan al mar miles de toneladas métricas de desperdicios orgánicos, ya que se carece de técnica para utilizar este potencial como fuente de ingresos y lograr un aprovechamiento integral de los subproductos adicionales (Reynaga, 1979).

El proceso de extracción de quitina y quitosán consiste en la remoción de constituyentes calcáreos, minerales y proteínas, que forman parte integral de las cubiertas quitinosas de los caparzones de cangrejos, camarones y langostas. Los minerales, como el carbonato de calcio son removidos por soluciones ácidas que pueden ser reciclables (Ashford et al., 1977) y manufacturados en compuestos clorados o salmueras de cloruro de calcio y darles uso en las industrias del papele y en la industria del cemento (Johnson y Peniston, 1982).

Por otra parte, la proteína es removida en soluciones de álcalis, que al igual que las sales pueden ser reciclables (Ashford et al., 1977), dándoles un uso en la industria de alimento para ganado como aditivo; o bien, se pueden encontrar cantidades significativas de astaxantina que es un pigmento natural importante asociado a la proteína y que también es potencialmente manufacturable (Perceval, 1982).

La producción industrial de la quitina/quitosán no sólo es viable, sino que se elabora ya en plantas piloto de EEUU (Johnson y Peniston, 1982) y desde hace algunos años se evalúa como un recurso potencial nuevo en diferentes campos entre los que se incluyen aplicaciones médicas, industrias de alimentos, de productos fotográficos, productos químicos, productos de belleza, floculantes y en procesos biotecnológicos (Rha, 1984).

El aprovechamiento del potencial farmacológico de especies de las costas de Baja California contribuye a la elaboración de productos con posibles usos en la industria farmacéutica; los desechos de caparazón de langosta (*Panulirus interruptus*) sirven como materia prima para la obtención de quitina y a partir de esta, para la producción de quitosán; evaluando la actividad hipocolesterolemica de este último al compararsele con un producto comercial, y de esta forma promoviendo una explotación racional del recurso.

ANTECEDENTES.

Los polisacáridos marinos juegan un papel importante en los procesos biotecnológicos incluyendo su uso en la fabricación de cápsulas de liberación prolongada, como soporte de materiales, y como precursor o materia prima para la elaboración de otros productos (Knorr, 1988). La habilidad de formación de gel de muchos de estos polímeros (agar, carragenanos, alginatos, etc.) permite su uso como emulsificadores y estabilizadores y como componentes importantes de medios de crecimientos en microbiología y cultivo de células; además, son usados en cromatografías de afinidad, para la separación por pesos moleculares y como un medio electroforético esencial en el mapeo de genes y en la selección de fragmentos de DNA para el enlace de éstos (Knorr, 1988).

Dentro de los polisacáridos marinos se encuentra el quitosán, que debido a su naturaleza cátonica, juega un papel especial y posee propiedades únicas (Kobayashi, 1979). Las propiedades clave del quitosán son: biocompatibilidad; baja toxicidad, muestra habilidad para aliviar quemaduras, habilidad para absorber líquidos y formar membranas protectoras (Sandford, 1989). Además el quitosán es un medio de proporcionar fibra en las dietas y se ha reportado que actúa como un reductor del colesterol (Kobayashi, 1979).

Actualmente es considerable el interés en las actividades hipocolesterolémicas de sustancias dietéticas no-nutritivas (Kobayashi, 1979). Esto es debido a la correlación epidemiológica entre las elevadas concentraciones de lípidos en el suero y la incidencia de muerte por aterosclerosis (Nagyvary, 1979). La aterosclerosis es un defecto del metabolismo en el que el colesterol se deposita en las paredes internas de los vasos sanguíneos conjuntamente con otros lípidos y cuando ocurre en exceso, conduce al estrechamiento primero y a la oclusión más tarde, de los vasos sanguíneos; sin embargo, el colesterol es una sustancia que se encuentra en la sangre y en muchos tejidos como parte normal del organismo (Espino-Vela, 1991). Debido al problema de la aterosclerosis se ha alentado a investigadores de todas las áreas para que manejen métodos de química extractiva, o busquen enfo-

ques novedosos en cuanto al posible uso clínico de productos naturales (Laguna-García, 1985).

Se sabe que entre las sustancias que afectan el nivel del colesterol en el suero e hígado se encuentran varios polisacáridos y resinas de intercambio aniónico (Kobayashi, 1979). El más utilizado actualmente es la colestiramina, que es una resina sintética, con grupos funcionales de amonio cuaternario enlazados a una matriz del copolímero divinilestirenbenceno. *The National Heart, Lung and Blood Institute* (Bethesda), encontró que esta sustancia reduce significativamente los niveles de colesterol circundante en el hombre en una hipocolesterolemia primaria (Gordon and Besch-Williford, 1984).

En virtud de su naturaleza catiónica, el quitosán puede ser considerado un análogo natural de la colestiramina (Nagyvary, 1979) con la ventaja de que el quitosán no causa constipación o diarrea (Sugano et al., 1980), ni dolor abdominal, eructos, acedía, cardialgia, náuseas y vómito (Gordon, 1984). El quitosán tiene varias ventajas importantes sobre la colestiramina, ya que es un producto natural y relativamente de baja toxicidad (Lands y Bough, 1976, citados por Gordon y Besch-Williford, 1984). Pero, a pesar de estas condiciones, se requieren más datos que muestren aspectos nutricionales y toxicológicos que ayuden a determinar su eficacia como droga para múltiples aplicaciones en la medicina humana; pues se sabe que la estructura molecular de la quitina o del quitosán puede estar influenciada por la materia prima que se utilice para su preparación (Averbach, 1977); esto sugiere que cada especie de camarón, cangrejo, langosta, etc. requiera diferentes procesos para obtener un producto uniforme (Averbach, 1977).

Las variaciones en los reactivos usados, las concentraciones de cada uno de ellos, el tiempo y la temperatura del tratamiento, determinan la calidad y composición del producto (Wu and Bough, 1977).

Las implicaciones de un mejor conocimiento de la naturaleza del quitosán repercute en la conservación del recurso, prevención de la contaminación, en la agricultura y en la in-

dustria de alimentos entre los usos más obvios. La quitina y el quitosán cumple con numerosas demandas en nuestro mundo tecnológico y al mismo tiempo, son polímeros clave para la preservación de nuestro medio ambiente (Muzarelli, 1977).

OBJETIVO

Evaluar la actividad hipocolesterolémica del quitosán extraído del caparazón de langosta roja (*Panulirus interruptus*), por el método modificado de Hackman (1954, modificado por Castillo-Rosales, 1991) y Broussignac (1968).

METODOLOGIA.

1. Descripción del Recurso Natural.

La langosta roja (*Panulirus interruptus*) es una especie de importancia comercial cuyo habitat se localiza en fondos rocosos arrecifales; se encuentra ampliamente representada en mares fríos, templados y tropicales. Presenta una regionalización bien definida desde San Luis Obispo en California, hasta la Isla Margarita en Baja California Sur, encontrándose también en el Golfo de California (Secretaría de Pesca, 1987).

2. Obtención de Quitina y Quitosán

En la Fig. 1 se ilustran de manera esquemática las diferentes etapas que se siguieron para la obtención de quitina y quitosán.

2.1) Colecta de exoesqueletos de langosta.

Para la obtención de quitosán se usaron exoesqueletos de langosta (*Panulirus interruptus*) que fueron aportados por el Restaurant Puerto Nuevo II, ubicado en Puerto Nuevo (comunidad de restaurantes de especialidades marinas), B.C., México. Una vez en el laboratorio, se eliminó grasa, suciedad y residuos de tejido muscular y se lavaron con agua dulce con el fin de evitar cualquier daño por acción bacteriana; el material fue secado de acuerdo a las condiciones utilizadas por Castillo-Rosales (1991): al aire libre durante 4 horas y en estufa a 80°C durante 5 horas, posteriormente el material fue molido y pasado por un tamiz de luz de malla de 1 mm.

2.2) Obtención de quitina y quitosán.

Las condiciones de extracción de quitina y transformación de ésta a quitosán fueron las seleccionadas de acuerdo a los datos proporcionados por Castillo-Rosales (1991); quien, en base a los parámetros fisicoquímicos y propiedades analizadas, reporto que la muestra que mejores condiciones de aplicabilidad comercial reflejó fue el lote cuyas condiciones de

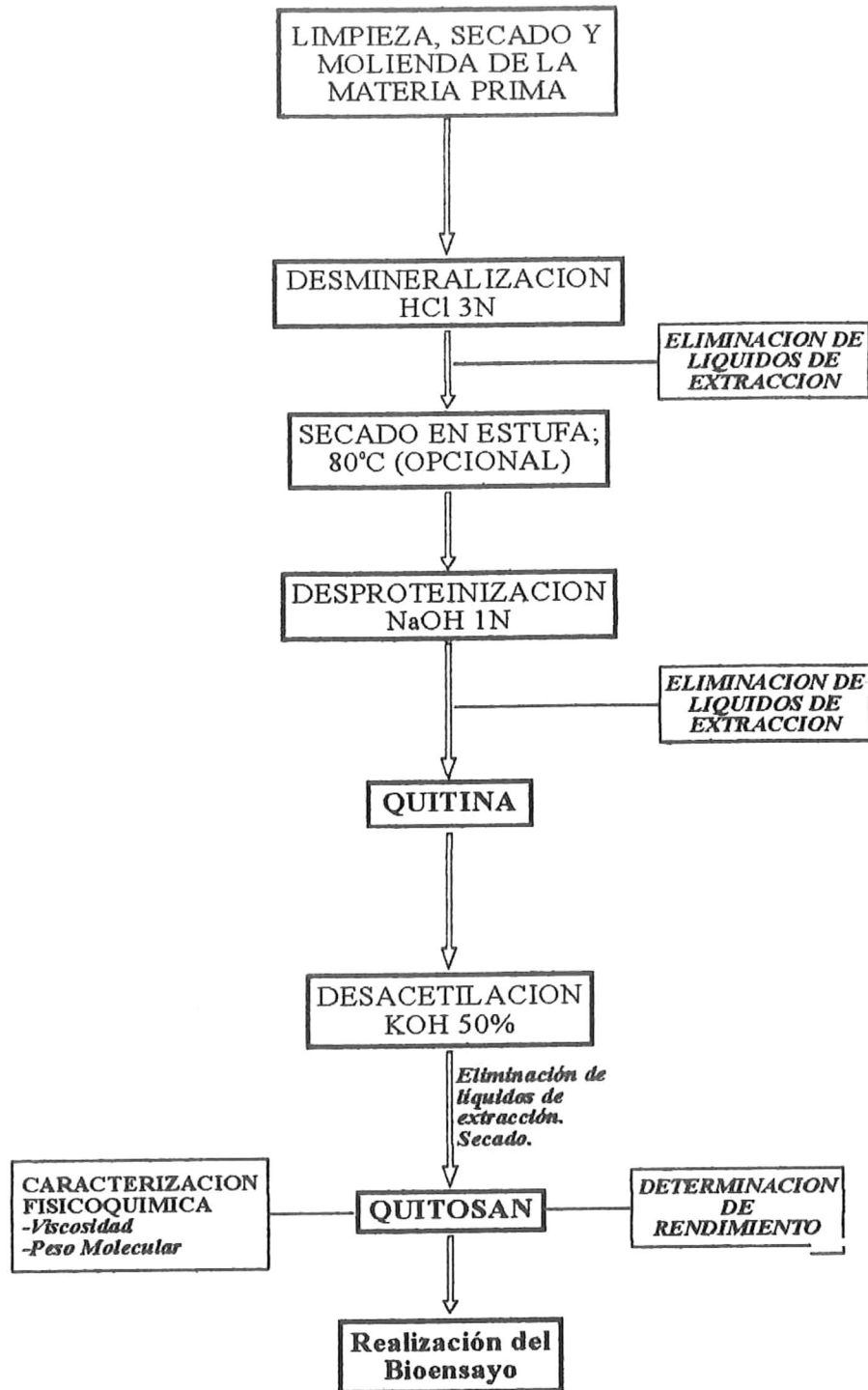


Fig. 1.- Diagrama de flujo para la obtención y estudio del quitosán, método modificado de Hackman (1954) y Broussignac (1968) a partir del caparazón de langosta (*Panulirus interruptus*)(Modificado por Castillo-Rosales, 1991).

extracción fueron: HCl 3N, NaOH 1N y cinco horas de desacetilación.

2.2.1. Desmineralización. Al caparazón de langosta seco y molido se le agregó HCl 3N y se mantuvo en agitación constante a temperatura ambiente durante 48 horas; al término de las cuales las partículas se lavaron con agua desionizada hasta pH 4.

2.2.2. Desproteinización. A las muestras desmineralizadas se les añadió NaOH 1N durante 36 horas con agitación constante; cada 12 horas se renovó la solución de NaOH. Las partículas extraídas al final del tratamiento se lavaron con agua desionizada hasta un pH de 4 y se secaron las partículas a 90°C durante 4-5 horas.

2.2.3. Desacetilación. La obtención del quitosán se llevó a cabo por hidrólisis de los grupos acetilos en una solución de hidróxido de potasio (KOH) a reflujo durante 5 horas a 100°C. El quitosán resultante se recolectó por decantación y filtración a presión reducida. Se lavó con agua desionizada hasta pH neutro, se secó en estufa durante 3 horas a 70°C.

Los lotes que se obtuvieron de quitosán fueron rotulados con números romanos de acuerdo al orden de extracción, si los lotes fueron por duplicado o por triplicado se le añadió una letra del abecedario.

3. Caracterización Físicoquímica.

Para la determinación de viscosidad absoluta se utilizó la densidad del solvente (ácido acético 0.2M/NaCl 0.1M/urea 4M) y el tiempo que tarda en pasar la solución al 1.2% en un viscosímetro UBBELOHDE TYPE #3 (Standard test ASTM D445), cuya constante es de 1.008 Centistokes/seg. La fórmula de viscosidad absoluta es:

$$\eta = ct\delta \quad (\text{Ec. 3.1.})$$

donde: η =viscosidad absoluta

δ =densidad del solvente (1.0054 g/ml.)

c =constante del aparato (1.008 centistokes/seg.)

t=tiempo (segundos).

Para la determinación del Peso Molecular se utilizó la formula:

$$[\eta]=KM^a \quad (\text{Ec. 3.2.})$$

en donde: $[\eta]$ = viscosidad intrínseca
 $K=8.93 \times 10^{-4}$
 $a=0.71$
 M =masa molecular del polímero

La viscosidad relativa es igual a:

$$N_s/N_o \quad (\text{Ec. 3.3.})$$

donde: N_o = tiempo en que fluye el solvente (ácido acético/urea/NaCl)
 N_s = tiempo en que fluye la solución.

Esta viscosidad relativa es utilizada para determinar la viscosidad específica en donde:

$$N_s/N_o - 1 = \text{Viscosidad específica} \quad (\text{Ec. 3.4.})$$

En base a los dos anteriores cálculos se obtuvo la viscosidad intrínseca, esto se logro al graficar la viscosidad especifica entre la concentración en función de. la concentración de una serie de diluciones para cada lote de quitosán. La intersección de la recta con el eje de las "y" correspondio a la viscosidad intrínseca, dicha viscosidad fué utilizada para calcular el Peso Molecular del quitosán.

4. Bioensayo

4.1) Organismo de Prueba.

Se utilizaron 24 ratas macho de la raza Sprague-Dawley (rata albina de cabeza an-gosta y cola más larga que su cuerpo; menos resistente a enfermedades respiratorias)(Delgado-Buenrostro y Revueltas-Miranda, 1993) que fueron compradas en la Ciudad de México en "El Conejito" y transportadas al laboratorio de Farmacología Marina de la Facul-

tad de Ciencias Marinas, en la Unidad Enseñada de la UABC.

4.2) Dieta

Se prepararon cuatro dietas para el bioensayo, la composición de éstas se muestra en la Tabla I. La mezcla de vitaminas y minerales está conformada según la Tabla II, La mezcla de vitaminas que se añadió a la dieta fué proporcionada por el complemento vitamínico con el nombre comercial Enfapro polvo; los constituyentes de los dos tipos de mezcla son los recomendados por Harper (1958).

El quitosán que se utilizó fueron los de los lotes 7, 8 y 9A y se seleccionaron de acuerdo a su Peso Molecular, con el criterio de semejanza de pesos.

Los diferentes tipos de dieta fueron los siguientes:

1.- Dieta Basal (**DB**). Esta dieta contenía caseína, proteína vegetal, mezcla de vitaminas, mezcla de minerales, cloruro de colina, celulosa, azúcar, vitamina E, inositol y a diferencia de las tres siguientes es la única que tenía aceite de maíz en lugar de manteca, lo cual asegura que el único colesterol presente en los posteriores análisis de sangre e hígado fuera el que el organismo sintetiza.

2.- Dieta-Questran (**DQE**). Esta dieta está conformada de los mismo componentes que una dieta basal, aunque a diferencia de esta, tenía manteca (grasa de origen animal) y colesterol; estos dos últimos componentes además de los de la dieta basa (sin el aceite) fueron los que conformaron una dieta normal. Esta dieta tuvo otro componente que es el questran, un hipocolesterolémico comercial (resina sintética). Esta dieta se utilizó como testigo, con el fin de comparar resultados de la disminución de concentraciones de colesterol de un hipocolesterolémico comercial (el más común en el mercado) y de la sustancia de prueba, en este caso el quitosán.

3.- Dieta-Quitosán (**DQI**). Es la dieta basal más la sustancia de prueba, el objetivo de esta dieta fué la de probar la actividad hipocolesterolémica del quitosán y su efectividad

TABLA I. Constituyentes básicos de las dietas basal, questran, quitosán y colesterol en base a Sugano (1980), proporcionadas a los animales de experimentación "ad libitum" durante la realización del bioensayo.

CONSTITUYENTES ^a	DIETA BASAL (%)	DIETA-QUESTRAN (%)	DIETA-QUITOSAN (%)	DIETA-COLESTEROL (%)
CASEINA	62.5 } 37.5 } 20	62.5 } 37.5 } 20	62.5 } 37.5 } 20	62.5 } 37.5 } 20
PROTEINA VEGETAL ^a				
ACEITE DE MAIZ ^b	5	-----	-----	-----
MANTECA	-----	5	5	5
MEZCLA DE MINERALES ^c	4	4	4	4
MEZCLA DE VITAMINAS ^d	1	1	1	1
CLORURO DE COLINA	0.15	0.15	0.15	0.15
CELULOSA	4.5	2.5	2.5	4.5
AZUCAR	65.35	64.85	64.85	64.85
QUITOSAN	-----	-----	2	-----
QUESTRAN	-----	2	-----	-----
COLESTEROL	-----	0.5	0.5	0.5

a. La proteína vegetal sirve como aglutinante y posee enzimas digestivas.

b. Aceite de maíz, Mazola.

c, d. La mezcla de minerales y vitaminas se muestra en la Tabla I. (Harper, 1958)

e. Cápsulas comerciales (400 mg de vit. E). Se agregaba 1 cápsula por Kg de alimento y se añadían 3 gotas de inositol por Kg. de alimento.

TABLA II. Constituyentes de mezcla de vitaminas y minerales (Harper, 1958), adicionadas a las dietas y suministradas a los organismos de prueba a lo largo del bioensayo.

VITAMINAS	(%) VALORES BIBLIOGRAFICOS	ENFAPRO POLVO ^a en 100 g.	MINERALES	(%) VALORES BIBLIOGRAFICOS
B ₁	50 mcg.	420 mcg.	CaCO ₃	29.29
B ₂	50 mcg.	1050 mcg.	CaHPO ₄ (H ₂ O)	0.43
Ac. Nicotínico	250 mcg.	5600 mcg.	NaH ₂ PO ₄	30.25
Pantotenato de calcio	200 mcg.	3500 mcg.	NaCl	10.33
B ₆	25 mcg.	350 mcg.	MgSO ₄ (7H ₂ O)	9.98
K	5 mcg.	42 mcg.	Fe(C ₄ H ₅ O ₇)(6H ₂ O)	0.62
H	1 mcg.	17 mcg.	CuSO ₄ (5H ₂ O)	0.16
Ac. Fólico	2 mcg.	42 mcg.	MnSO ₄ (H ₂ O)	0.12
B ₁₂	0.12 mcg.	2.8 mcg.	ZnCl ₂	0.02
Inositol	10 mg.	28 mg.	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ (4H ₂ O)	0.0025
C	5 mg.	56 mg.	KCl	18.80
E ^b	10 mg/100 g.	8.4 IU.	KI ^c	0.0005
A	400 IU.	1470 IU.		
D	200 IU.	280 IU.		
Colina	1500 mg/Kg.	56 mg		

a. Diccionario de especialidades farmacéuticas, 1992.

b. Cápsulas comerciales.

c. Enfapro polvo cubría todos los requerimientos de Yodo (I).
valor bibliográfico (38.2 mcg.), enfapro polvo (42.0).

con respecto a un hipocolesterolémico comercial (Questran).

4.- Dieta-Colesterol (DC). Los constituyentes de esta dieta son constituyentes de la dieta basal e igualmente se le agrego colesterol. Con esta dieta se probó si en realidad el consumo de grasa y colesterol en las dos dietas anteriores aumento los niveles de colesterol en sangre e hígado.

4.3) Acondicionamiento.

El acondicionamiento tuvo una duración de 40 días, desde que llegaron hasta el inicio del bioensayo, manteniendo a cada rata en jaulas separadas, a una temperatura de aproximadamente 22-25 grados centígrados. El peso de las ratas fué monitoreado cada tercer día, antes de iniciar el bioensayo y diario durante el bioensayo.

4.4) Bioensayo.

En la Fig. 2 se observa el seguimiento de actividades hasta la realización del bioensayo; 24 ratas macho de 70 días de edad se distribuyeron en cuatro grupos de 6 animales c/u, a las que se les proporcionó agua y alimento *ad libitum*.

Grupo Control, se le proporcionó una dieta basal (DB).

Grupo Testigo, se le proporcionó una dieta-questran (DQE).

Grupo de Prueba #1, se le proporcionó una dieta-quitosán (DQI).

Grupo de Prueba #2, se le proporcionó una dieta-colesterol (DC).

4.5) Análisis de Colesterol en Sangre e Hígado

Se utilizó el método de Liebermann-Burchard modificado para determinar concentraciones de colesterol (Rendina, 1971). Este método consistió esencialmente en lo siguiente: a 2 ml. de solución diluída de muestra (0.02%) en cloroformo colocados en tubos secos, se añadieron 15 gotas de anhídrido acético y mezclar. Posteriormente se añadieron 5 gotas de ácido sulfúrico concentrado, se mezcló y se dejó en reposo de 15 a 20 min. Se midió la ab-

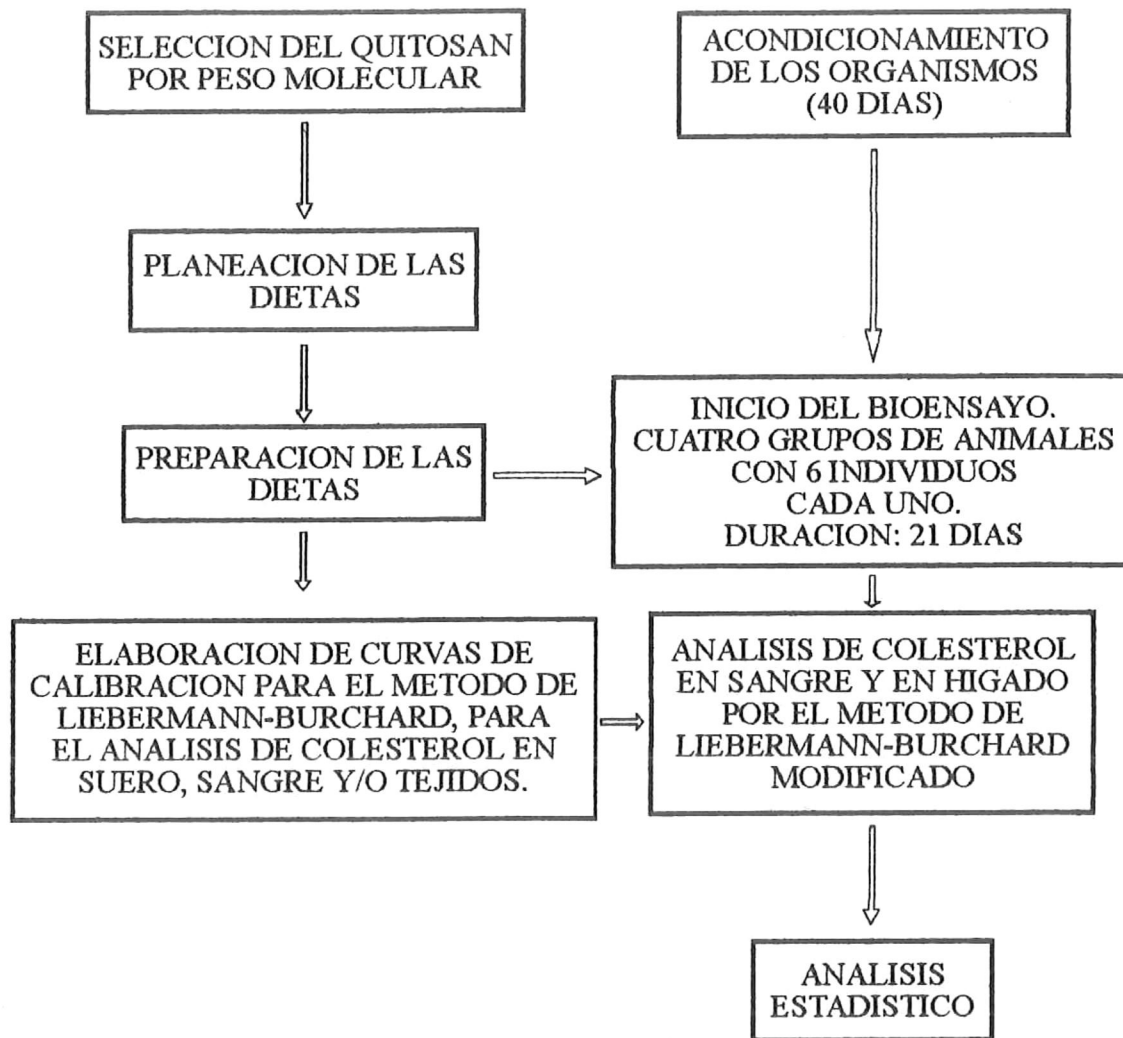


Fig. 2.- Diagrama de flujo para la realización del bioensayo en ratas (Sprague-Dawley) para la evaluación del efecto hipocolesterolémico del quitosán extraído de langosta (*Panulirus interruptus*).

sorbancia a 625 nm.

i) Pretratamiento para sangre. Se aplicó el Método de Folch Modificado (Dryer, 1972).

A 2.5 ml. de metanol en un tubo de centrifuga, se le agrego 0.5 ml. de suero con una micropipeta, se lavo con metanol y se regreso al tubo. Se mezclo bien el contenido del tubo y se le dejo en reposo durante 5 min.

Se agregaron otros 2.5 ml. de metanol; se mezclo bien y se dejo en reposo durante 5 min.

Se agregaron 5 ml. de cloroformo, se mezclo bien, se tapo el tubo y se le dejo en reposo 5 min., después de lo cual se centrifugo la solución para recoger la proteína finamente precipitada.

De la solución cloroformo-metanol se tomaron 7 ml. se evaporaron a sequedad, se dejaron enfriar, posteriormente se agregaron 4 ml de cloroformo, para después seguir el método de Liebermann-Burchard (Rendina, 1971).

ii) Pretratamiento para hígado.

A 2.5 ml de metanol en un tubo de centrifuga, se le agrego 0.5 mg. de tejido homogenizado. Se mezclo bien el contenido del tubo y se le dejo en reposo durante 5 min.

Se agregaron otros 2.5 ml. de metanol; se mezclo bien y se dejo en reposo durante 5 min.

Se agregaron 5 ml. de cloroformo, se mezclo bien, se tapo el tubo y se le deja en reposo 5 min., después de lo cual se centrifugo la solución para eliminar la proteína finamente precipitada.

De la solución cloroformo-metanol se tomo una alícuota de 0.16 ml. y se llevo a un volumen total de 2 ml. con cloroformo. Se determino el colesterol con el método de Liebermann-Burchard (Rendina, 1971).

4.6) Análisis estadístico.

Se determinó la normalidad de los datos de peso ganado para cada grupo mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov (a un nivel de significancia de 0.05).

Se aplicó la prueba t de Student (a un nivel de significancia de 0.05) para muestras independientes, con el fin de probar la no significancia en el crecimiento de los organismos que componen los cuatro diferentes grupos para el bioensayo (el registro, del crecimiento de los animales se muestra en la gráficas -apéndice I- que nos señalan el desarrollo de cada organismo desde su llegada a las instalaciones de la Facultad de Ciencias Marinas, hasta la finalización del bioensayo).

La prueba Kolmogorov-Smirnov (a un nivel de significancia de 0.05) se aplicó a los valores de concentración de colesterol en hígado y sangre por grupo, para determinar la normalidad de la población; y para evaluar efectos de cada dieta se aplicó al prueba t de Student (a un nivel de significancia de 0.05) para muestras independientes en la que se probó la hipótesis nula de que no existía diferencia significativa entre la dieta correspondiente y la dieta basal, en donde el parámetro utilizado como indicador fué el nivel de colesterol en sangre y en tejido hepático (Infante-Gil y Zarate-de-Lara, 1991).

RESULTADOS

I. Caracterización Físicoquímica.

La Tabla III presenta los valores de viscosidad específica y concentración que se utilizaron para la preparación de las gráficas (apéndice II), de las cuales se obtuvo la viscosidad intrínseca para cada lote de quitosán; la serie de diluciones van desde un 0.4 hasta 1.2% para cada lote. De la densidad de estas soluciones depende el tiempo que tarda en fluir la solución a través del viscosímetro; esto es importante, ya que mientras mayor sea el tiempo que tarda en fluir la solución y menor el tiempo en que fluye el solvente, mayor será la viscosidad relativa, mayor la viscosidad específica y por ende mayor será la viscosidad intrínseca. Al mismo tiempo se muestra la ecuación de la recta de cada serie de datos en la cual, el término independiente es la ordenada al origen e igualmente es la viscosidad intrínseca.

En la Tabla IV se registran los Pesos Moleculares obtenidos a partir de los valores de viscosidad intrínseca (Ec. 3.2 de la sección 3 de la "Metodología"); en donde se observa, que los valores más altos de Peso Molecular fueron los de los lotes 5A, 7, 8, y 9A. También se muestra que los valores más altos de viscosidad absoluta (Ec. 3.1 de la sección 3 del "Método"), se presentan en los ya mencionados lotes 5A, 7, 8 y 9A. En esta Tabla se aprecian al mismo tiempo los valores de rendimiento para cada lote de quitosán, de los cuales los lotes 5B, 7, 8, 9A, 9B, 9C y 9D presentan una variabilidad mínima.

II. Bioensayo.

Peso.

Los valores de peso inicial y peso ganado durante el bioensayo se muestran en la Tabla V, así como los promedios para cada grupo de prueba; a los valores de cada grupo de prueba con el nombre de peso ganado se les aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov (Tabla VI) dando un valor calculado menor que el valor crítico de 0.519, lo que implica que la población fue normal.

TABLA III. Valores de viscosidad específica entre la concentración en función de la concentración para cada uno de los lotes de quitosán y su correspondiente ecuación de la recta, donde se muestran los valores de viscosidad intrínseca (ordenada al origen).

LOTE #	CONCENTRACION	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	Ecuación de la Recta
	<i>Viscosidad específica concentración</i>						
1			2.6	3.2	3.7	4.1	$Y = 2.4x + 1.7$
3	7.3	10.8	14.9	21.2	30.9		$Y = 28.8 + (-6.0)$
5A	13.6	16.7	27.0	46.3	71.2		$Y = 72.4x + (-23.0)$
5C	8.4	11.1	15.4	25.8	35.2		$Y = 34.1x + (-8.1)$
7	6.3	10.9	17.4	23.9	40.3		$Y = 40.5 + (-12.7)$
8	6.9	9.9	16.3	24.4	37.6		$Y = 38.0 + (-11.4)$
9A	6.2	10.0	15.2	22.0	36.9		$Y = 36.7 + (-11.2)$
9B	7.3	11.0	16.0	23.1	34.5		$Y = 33.2 + (-8.2)$

TABLA IV. Rendimiento y propiedades fisicoquímicas del quitosán obtenido a partir de caparazón de langosta (*Panulirus interruptus*) por el método de Hackman (1954) y Broussignac (1968), modificado por Castillo-Rosales (1991).

Número de lote	Rendimiento (%)	Viscosidad Absoluta (c.p.)	Peso Molecular
1	3.27	N.D.*	40, 462
3	6.52	39.4	246, 886
5A	16.0	83.8	1, 624, 327
5B	13.7	N.D.*	N.D.*
5C	17.5	45.9	375, 629
7	13.2	41.9	679, 831
8	13.1	46.3	604, 770
9A	12.9	40.2	593, 966
9B	11.9	42.6	381, 672
9C	13.6	N.D.*	N.D.*
9D	13.1	N.D.*	N.D.*

* No se Determinó

TABLA V. Valores de peso inicial y peso ganado por cada animal de experimentación, durante el bioensayo.

	CONTROL Dieta Basal	TESTIGO Dieta-Questran	GRUPO #1 Dieta-Quitósán	GRUPO #2 Dieta-Colesterol
PESO INICIAL (g.)	162.4	182.1	203.4	132.5
	147.0	186.7	199.7	119.1
	146.1	185.5	196.5	116.5
	130.0	171.6	193.9	116.9
	129.9	175.9	195.9	117.2
	135.3	169.2	193.0	108.2
PESO GANADO (g.)	86.3	82.2	24.1	55.5
	39.2	83.2	61.3	61.8
	93.4	65.5	71.4	57.3
	41.5	60.9	46.0	67.2
	60.0	62.3	89.0	67.2
	57.1	68.4	60.0	65.2
PROMEDIO PESO INICIAL (g.)	$\bar{X}=141.8 \pm 12.2$	$\bar{X}=178.5 \pm 7.3$	$\bar{X}=197.1 \pm 4.0$	$\bar{X}=118.4 \pm 7.8$
PROMEDIO PESO GANADO (g.)	$\bar{X}=62.9 \pm 22.1$	$\bar{X}=70.4 \pm 9.6$	$\bar{X}=58.6 \pm 22.1$	$\bar{X}=62.4 \pm 4.8$

TABLA VI. Resultados del estadístico Kolmogorov-Smirnov (a un nivel de significancia de 0.05), para los valores de peso ganado.

	d calculada	d teórica
GRUPO CONTROL (DB)	0.3000	0.519
GRUPO TESTIGO (DQE)	0.1926	0.519
GRUPO #1 (DQI)	0.1863	0.519
GRUPO #2 (DC)	0.2914	0.519

La prueba t Student (Tabla VII) para comparación entre grupos se aplicó a los valores promedio que pertenecieron a los diferentes grupos con el nombre de peso ganado, donde se demostró que no existió diferencia significativa en peso ganado entre los diferentes grupos; aunque se muestren valores tan diferentes entre sí, como lo son el de 24.1 g. que pertenece al grupo #1 y el de 93.4 g. que pertenece al grupo control.

Concentración de colesterol.

Los resultados de concentración de colesterol tanto en sangre como en hígado se presentan en la Tabla VIII, cada uno presenta los diferentes promedios para cada grupo de prueba, observando la similitud entre los promedios de colesterol en sangre de los grupos testigo (DQE), #1 (DQI) y #2 (DC) y una sensible diferencia de los tres anteriores con el grupo control (DB). La Tabla IX muestra los valores del estadístico Kolmogorov-Smirnov para las concentraciones de colesterol en sangre e hígado, de cada grupo. Al comparar los valores de la d calculada y la d crítica, se observa que esta última es mayor, por lo que los valores pertenecen a una población normal. La Tabla X muestra los valores del estadístico t Student, en los que se encuentra que la prueba fué significativa (a un nivel de significancia de 0.05) para la comparación entre los grupos testigo (DQE), grupo #1 (DQI) y grupo #2 (DC) contra el control (DB) y no significativa para la comparación entre los grupos testigo (DQE)-grupo #1 (DQI), testigo (DQE)-grupo #2 (DC) y grupo #1 (DQI)-grupo #2 (DC).

El análisis de los valores de colesterol en hígado (Tabla X) nos muestra que existe diferencia significativa del grupo control (DB) comparado con el testigo (DQE) y los grupos de prueba #1 (DQI) y #2 (DC); el grupo #2 (Dieta Colesterol) también muestra una diferencia significativa al comparársele con el grupo testigo (Dieta Questran) y el grupo #1 (Dieta Quitosán); no así, la comparación del testigo (DQE) y grupo #1 (DQI), pues la prueba t Student (Tabla X), muestra que no existe diferencia entre los valores obtenidos de uno u otro grupo.

TABLA VII. Resultados del estadístico "t" Student (comparación entre medias a un nivel de significancia de 0.05), para los valores de peso ganado.

	t calculada	t teórica
CONTROL-TESTIGO	0.75	1.812
CONTROL-GRUPO #1	0.33	1.812
CONTROL-GRUPO #2	0.055	1.812
TESTIGO-GRUPO #1	1.192	1.812
TESTIGO-GRUPO #2	1.77	1.812
GRUPO #1-GRUPO #2	0.40	1.812

TABLA VIII. Valores correspondientes a concentraciones de colesterol en la sangre e hígado de cada individuo.

	CONTROL Dieta Basal	TESTIGO Dieta-Questran	GRUPO #1 Dieta-Quitosan	GRUPO #2 Dieta-Colesterol
COLESTEROL EN SANGRE (mg%)	42.0 38.5 47.5 42.0 57.0 48.5	65.5 43.5 52.0 64.5 60.0 44.5	56.0 52.0 52.0 72.5 61.0 59.5	69.0 51.5 60.0 45.5 61.0 55.0
COLESTEROL EN HIGADO (mg/g)*	2.12 1.18 4.52 1.21 0.92 0.01	18.55 3.82 19.95 9.94 23.44 23.30	20.03 18.39 24.90 12.97 28.63 18.53	30.12 34.45 35.60 26.20 21.76 80.06
PROMEDIO colesterol en sangre (mg%)	$\bar{X} = 45.9 \pm 6.8$	$\bar{X} = 55.0 \pm 9.6$	$\bar{X} = 58.8 \pm 7.8$	$\bar{X} = 57.0 \pm 8.4$
PROMEDIO colesterol en hígado (mg/g)	$\bar{X} = 1.7 \pm 1.4$	$\bar{X} = 16.5 \pm 7.8$	$\bar{X} = 20.6 \pm 5.3$	$\bar{X} = 38.0 \pm 21.2$

* Pesos de los hígados en la Tabla I del ANEXO II.

TABLA IX. Resultados del estadístico Kolmogorov-Smirnov (a un nivel de significancia de 0.05) para los valores de concentración de colesterol en sangre e hígado.

		d calculada	d teórica
GRUPO CONTROL (DB)	SANGRE	0.2094	0.519
	HIGADO	0.1490	0.519
GRUPO TESTIGO (DQE)	SANGRE	0.1472	0.519
	HIGADO	0.3106	0.519
GRUPO #1 (DQ)	SANGRE	0.2128	0.519
	HIGADO	0.2100	0.519
GRUPO #2 (DC)	SANGRE	0.1358	0.519
	HIGADO	0.2770	0.519

TABLA X. Resultados del estadístico "t" Student (comparación entre medias a un nivel de significancia de 0.05), para los valores de concentración de colesterol en sangre e hígado.

		t calculada	t teórica
CONTROL- TESTIGO	SANGRE	1.89	1.812
	HIGADO	4.50	1.182
CONTROL- GRUPO #1	SANGRE	3.13	1.812
	HIGADO	8.12	1.812
CONTROL- GRUPO #2	SANGRE	2.58	1.812
	HIGADO	4.19	1.812
TESTIGO- GRUPO #1	SANGRE	0.76	1.812
	HIGADO	1.04	1.812
TESTIGO- GRUPO #2	SANGRE	0.38	1.812
	HIGADO	2.33	1.812
GRUPO #1- GRUPO #2	SANGRE	0.40	1.812
	HIGADO	1.95	1.812

DISCUSION

La manipulación de condiciones en la obtención del quitosán provoca en este producto características químicas inconstantes y pesos moleculares variables. Esta falta de homogeneidad depende de la fuente de extracción (materia prima), de la temperatura, de la concentración de reactivos y del tiempo de extracción (Rutherford y Austin, 1977, citados por Castillo-Rosales, 1991). Las diferencias en los pesos moleculares, que se presentan en este trabajo con valores de peso molecular tan pequeños como el del lote 1 (PM=40,462) o valores tan altos como el del lote 5A (PM=1,624,327), denotan una diferencia con el resultado del trabajo de Castillo-Rosales (1991) quien bajo las mismas condiciones y con la misma especie obtuvo un peso molecular promedio de 907,789.

Un aspecto fundamental en la obtención de pesos moleculares homogéneos, es el tamaño de partícula del material inicial. Según Castillo-Rosales, (1991), mientras más grande es el tamaño de partícula, más difícilmente penetra el ácido en la matriz del caparazón, por lo que afecta no sólo la eliminación de minerales, que a su vez afecta la solubilidad de las muestras, sino también las características fisicoquímicas del producto intermedio (quitina) y del producto terminal (quitosán). Asimismo, el tamaño de partícula puede ocasionar un efecto de insuficiencia de álcali sobre la desproteínización o bien, un efecto de exceso en partículas pequeñas, con lo que se ocasionaría algo de destrucción en la molécula de la quitina. Ésta, al ser desacetilada a quitosán, provocaría a su vez la obtención de un producto de pesos moleculares variables.

Por otra parte, dado que los pesos moleculares dependen del comportamiento del quitosán en soluciones, Rinaudo y Domar, (1988), afirman que el peso molecular del quitosán es el parámetro más difícil de obtener con precisión. Esto proviene de la naturaleza del quitosán que conjunta factores relacionados entre sí (viscosidad, grado de desacetilación y pH de la solución), y provoca que sus propiedades se vean distribuidas en un amplio rango que varían de un autor a otro, e incluso, si no se controlan las condiciones del proceso, las

propiedades variarán en el estudio de un mismo autor (Garzón-S., et al., 1993).

Los valores obtenidos de viscosidad intrínseca de las soluciones de quitosán en ácido acético variaron de un lote a otro; marcando una notable diferencia entre los lotes 1 (1.7) y el lote 5A (23.0). Filar y Wirick (1977) explican que una desacetilación adecuada será suficiente para que exista una buena disolución en soluciones ácidas diluídas (pH menor a 6 ó 5.5), por lo que el grado de viscosidad del quitosán, dependerá de la solubilidad del polímero y de los cambios en la configuración molecular. Por su parte, Sung-Koo y Rha (1988), explican que las diferencias en las viscosidades de soluciones de quitosán se ven influenciadas por la fuerza iónica y el pH de la solución; ya que en un medio de baja densidad y un pH bajo, el equilibrio $-\text{NH}_2 + \text{H}^+ \rightleftharpoons -\text{NH}_3^+$ es llevado a la derecha, donde la molécula del quitosán asume una forma elongada por la mutua repulsión de los grupos cargados. De otra manera, un medio altamente ionizado hará que la repulsión electrostática de los grupos aminos se reduzca y la cadena tienda a compactarse, teniéndose entonces soluciones con viscosidades intrínsecas menores.

Por otro lado, podemos encontrar dentro de los resultados, valores de viscosidad absoluta más o menos uniforme como son los lotes 3 (39.4 cp.), 5C (45.9 cp.), 7 (41.9 cp.), 8 (46.3cp.), 9A (40.2 cp.) y 9B (42.6 cp.) y una apreciable diferencia de estos valores con el lote 5A que presenta un valor de 83.8 cp. Estas diferencias fueron originadas por los diferentes grados de desacetilación o por desacetilaciones incompletas. Un grado de desacetilación específico para que un polímero de quitosán sea completamente soluble es difícil de definir, ya que se sabe que muestras de quitosán con un 75% de desacetilación o más se disuelven fácilmente en ácidos orgánicos diluídos (Filar y Wirick, 1977).

Existen diversas clasificaciones del quitosán para sus diferentes usos; algunos autores (Filar y Wirick, 1977; Moorjani et al., 1977) separan al quitosán de acuerdo a su viscosidad absoluta; esta clasificación nos permite agrupar a los lotes de quitosán del presente trabajo en un quitosán de baja calidad. Sin embargo, el quitosán, independientemente del peso molecu-

lar o viscosidad es un producto comercial y con posibilidades de uso variable. Estos múltiples usos provienen no sólo de sus propiedades fisicoquímicas, sino de otras propiedades importantes como son las biológicas.

Los lotes 7, 8 y 9A de quitosán extraído de langosta (*Panulirus interruptus*) con pesos moleculares semejantes fueron utilizados para la preparación de las dietas del bioensayo, teniendo en cuenta que Sugano et al., (1988) mostró que la acción hipocolesterolemica del quitosán no depende del peso molecular dentro de un rango de viscosidad probado.

La realización de la prueba estadística Kolmogorov-Smirnov para los valores de peso ganado y concentración de colesterol en sangre e hígado para cada uno de los grupos arrojó valores menores de $d_{\text{calculada}}$ en comparación a la $d_{\text{crítica}} = 0.519$, lo que indica distribuciones normales en cada uno de los cuatro grupos de prueba. A los valores de peso ganado (por grupo) se les aplicó la prueba de "t" Student, determinándose que no existe diferencia en el peso ganado de los organismos entre grupos. Estos resultados nos conducen a que ninguno de los tres componentes adicionales de las dietas de prueba (colesterol, questran y quitosán) afectan en forma evidente el desarrollo de los organismos. Esto concuerda con lo mostrado por Sugano et al. (1980), quienes reportaron que ratas alimentadas con dietas conteniendo niveles de quitosán en un 5% disminuyen el peso ganado significativamente y que dietas con niveles de quitosán del 2 al 4% no reducen el crecimiento (peso ganado).

La naturaleza de las dietas del presente trabajo se ve reflejada en los resultados; por medio de los cuales observamos concentraciones bajas de colesterol, tanto en sangre como en hígado para el grupo control (DB) y concentraciones altas de colesterol para el grupo #2 (dieta-colesterol) en ambos tejidos; la diferencia estriba en el tipo de grasa presente en cada dieta.

Las dietas carentes de colesterol como la dieta basal (Grupo control), en la cual las grasas son de origen vegetal, provoca niveles bajos de colesterol que contrastan con las mayores concentraciones que ocasionaría una dieta rica en grasas de origen animal con la

adición de colesterol libre. Estos valores de colesterol ocasionadas por ambas dietas son el resultado del consumo de grasas insaturadas y saturadas, ya que el aumento en la cantidad de colesterol de la dieta incrementa la producción de LDL (lipoproteína transportadora de colesterol en el organismo), disminuye la actividad de receptores de colesterol de las células hepáticas para su posterior eliminación y aumenta el nivel plasmático de LDL (Dietschy, 1992). De esta manera, cuando se consumen grasas saturadas con una cantidad dada de colesterol, estos efectos son más pronunciados. No obstante, cuando se consumen grasas insaturadas, la actividad de los receptores se restablece parcialmente y disminuyen de forma significativa los niveles plasmáticos de LDL (Dietschy, 1992).

Hasta aquí se observó que las modificaciones dietéticas son importantes; sin embargo, eliminar de una dieta una sustancia indispensable como el colesterol o ácidos grasos, además de ser una medida exagerada, no es la solución a problemas de disfunción bioquímica que ocasionan hipercolesterolemia, relacionada a la aparición de aterosclerosis, y por tanto, al infarto al miocardio, infarto cerebral y arteriopatía periférica. Existen varias clases de agentes farmacológicos especialmente útiles para la disminución de LDL-Colesterol. En la actualidad se utilizan varias clases importantes de fármacos; el más empleado es la colestiramina o questran, utilizado en la dieta testigo para mostrar el efecto hipocolesterolémico y contrastarlo con el efecto ocasionado por el quitosán.

Las mayores concentraciones de colesterol en el hígado se presentaron en los organismos alimentados con la Dieta colesterol (Grupo #2), mientras que los organismos alimentados con la dieta basal (Grupo control) que mostraron las menores concentraciones de colesterol en el hígado. Por otra parte las dietas adicionadas con quitosán y questran suministradas a los organismos provocaron una disminución de los niveles de colesterol en el hígado semejante entre sí, logrando con esto concentraciones de colesterol en el hígado menores que los organismos del grupo #2 (DC) y a su vez concentraciones de colesterol en el hígado mayores que el grupo de ratas alimentadas con la dieta basal.

En lo que respecta a las concentraciones de colesterol en sangre, éstas carecen de una diferencia significativa entre los grupos alimentados con las dietas Questran (DQE), Quitosán (DQI) y Dieta-Colesterol (DC), aunque se observa una diferencia de concentración de colesterol de estos tres grupos en relación a las concentraciones que exhibe el grupo alimentado con la dieta basal (Grupo control), siendo menor la concentración de colesterol de este último grupo. Esto podría ser un indicio de que la dosis en las que se suministraron el questran y el quitosán no eran las adecuadas para observar un efecto de disminución de colesterol en sangre.

La magnitud del efecto de un hipocolesterolémico sobre las concentraciones de colesterol, tanto en hígado como en sangre están relacionadas con la dosis de este compuesto; además enlaza otros aspectos como son la producción de ácidos biliares, mecanismo de acción del hipocolesterolémico en el organismo y la actividad de los receptores de colesterol en el hígado.

La disminución del colesterol en el tejido hepático se vió ayudada por el mecanismo de acción del questran en el organismo. Este compuesto forma complejos insolubles con una emulsión formada por ácidos biliares y grasas y material lipídico en el intestino delgado y ocasiona su excreción por heces. Por otra parte, el questran inhibe la enzima que limita la producción de ácidos biliares (hidroxilasa microsomal). Y siendo el colesterol el precursor de los ácidos biliares, el aumento en la cantidad de éstos significa una disminución en la cantidad de colesterol. La excreción por heces y la inhibición enzimática provocan en conjunto una disminución de colesterol en el hígado. Sin embargo, la eliminación del colesterol en la sangre se ve más limitado, ya que éste es eliminado tan sólo por receptores que se encuentran en el hígado en un número finito y que reducen su actividad cuando aumenta la ingesta de grasas saturadas y colesterol, aumentando con ello los niveles de colesterol en la sangre. Este mecanismo de receptores es el factor principal en la disminución o aumento de colesterol en la sangre.

Sugano et al., (1980) observaron que el quitosán suministrado a niveles del 2% hace decrecer los niveles de lípidos en el hígado; pero no existe una disminución significativa en la sangre. En un estudio más reciente Sugano et al., (1988) mostraron que el quitosán a niveles de un 4 y 5% es efectivo en la prevención del colesterol. Los resultados de colesterol en el hígado para el grupo testigo (DQE) y el grupo #1 (DQI), sugieren un efecto hipocolesterolémico semejante, y coinciden con otros estudios en los que se supone que el quitosán trabaja en el organismo de la misma forma que el questrán. (Sugano et al., 1980).

Para concluir, se puede afirmar que debido a que el quitosán es un polisacárido natural biodegradable y de baja toxicidad puede ser utilizado y aplicado como material biomédico, no sólo por presentar bioactividad, ya que se ha demostrado su efecto hipocolesterolémico similar al questran, sino también por ser biocompatible y principalmente por provenir de un compuesto abundante y potencialmente explotable.

CONCLUSIONES

El quitosán extraído del caparazón de langosta (*Panulirus interruptus*) no afecta el crecimiento de ratas experimentales en concentraciones al 2%.

El quitosán extraído del caparazón de langosta (*Panulirus interruptus*) a niveles del 2% no disminuye las concentraciones de colesterol en sangre de ratas alimentadas con dietas ricas en colesterol o los precursores de la biosíntesis de éste.

El quitosán extraído del caparazón de langosta (*Panulirus interruptus*) a niveles del 2% disminuye la concentraciones de colesterol en el hígado de ratas alimentadas con dietas ricas en colesterol o los precursores de la biosíntesis de éste.

El efecto hipocolesterolémico del quitosán obtenidos del caparazón de langosta (*Panulirus interruptus*) no muestra diferencia significativa ($\alpha = 0.05$) con el efecto hipocolesterolémico del questrán (hipocolesterolémico comercial).

LITERATURA CITADA

A.O.A.C. (1975). *Methods of analysis*. 12 th. ed., Washington, D.C.

Ashford, N.A., Hattis, D. and A.E. Murray. (1977). *Industrial prospects for chitin and protein from shellfish wastes. A Report on the First Marine Industries Business Strategy Program Marine Industry Advisory Service. MIT-Sea Grant Program Massachusetts Institute of Technology. Cambridge, Massachusetts. pags. 76.*

Averbach, B.L. (1977). *Film-forming capability of chitosan. Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan. MIT-Sea Grant Program, Cambridge Mass. pp. 199-209.*

Castillo-Rosales, G. (1991). *Estudio Físicoquímico de Quitina Quitosán Extraídos del Caparazón de Langosta (*Panulirus interruptus*). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas. UABC. Ensenada, B.C.*

Delgado-Buenrostro, N.L. y M.E. Revuelta-Miranda. (1993). *Guía Práctica para el manejo de animales de laboratorio. UNAM. México.*

Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. (1992). Rosenstein, E. (Ed.). Ediciones P.L.M.

Dietschy, V.M. (1992). *LDL-colesterol: regulación y manipulación. Hospital Practice. Vol. 1. No. 7. Julio. Edición Mexicana.*

Dryer, R.L. (1972). *Lípidos. En Química Clínica Moderna. Tietz, W.N. (ed.). Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C. V. 1a. Edición. México.*

Espino-Vela, J. (1991). *Cuida tu Corazón. Enfermedades del Corazón Prevención y Tratamiento. 2a. Ed. Promotora Editorial, S.A. de C. V. México.*

Filar, L.J. and M.G. Wirick (1977). Bulk and solutions properties of chitosan. Proc. First Int. Conf. on Chitin/Chitosan., Muzzarelli, R.A.A. y E.R. Pariser ed., MIT-Sea Grant Program, Cambridge, MA. pp. 169-181.

Garzon-S, Ma. de L., Romero-M., A. y G. James-M. (1993) Quitina y quitosán para uso farmacéutico. Revista Mexicana de Ciencias. Farmacéuticas. Vol. 24. No. 4. Oct-Nov.

Gordon, D.T. and C. Besch-Williford (1984). Action of amino polymers on iron status, gut morphology, and cholesterol levels in the rat. In. Chitin, Chitosan and related enzymes. (Zilahis, J.P. ed.). Academic Press. Orlando Florida. pp. 97-117.

Harper, A.E., (1958). Amino acid balance and imbalance. Part I. Dietary level of protein and amino acid imbalance. J. Nutr. 68:405.

Hirano, S. (1988). Production and Application of Chitin and Chitosan in Japan. In. Proc. Fourth Int. Conf. on Chitin/Chitosan. pp. 37-43.

Infante-Gil, S. y G.P. Zárate-de-Lara. (1991). Métodos estadísticos. Un enfoque interdisciplinario. Ed. Trillas. México.

Johnson, E.L. and Q.P. Peniston. (1982). In. Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products. Avi Publishing Company United States of America.

Knorr, D., Beaumont, M.D. and Y Pandya. (1988). Potential of acid soluble and water soluble chitosans in biotechnology. In. Proc. Fourth Int. Conf. on Chitin/Chitosan. pp. 101-118.

Kobayashi, T., Otsuka, S. and Y. Yugari. (1979). Effect of chitosan on serum and liver cholesterol levels in cholesterol-fed rats. Nutrition Reports International. March. 1979. Vol. 19. No. 3.

Laguna-García, J. (1985). El desarrollo químico-farmacéutico y los problemas de salud pública de México. (Edit.). Salud Pública de México. Vol. 27. No. 6. Nov-Dic- México.

Moorjani, M.N., Iman Khasim, D., Rajalakshmi, S., Puharajappa, P. and B.L. Amla. (1977). Chitosan of high viscosity and protein as a valuable by-product from squilla. Proceedings of the First International Conference on Chitin/ Chitosan. MIT-Sea Grant Program, Cambridge Mass. pp. 210-216.

Muzzarelli, R.A.A. ed. (1977). Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan. MIT-Sea Grant Program, Cambridge Mass. pp. 1-10.

Nagyvary, J.J., Falk, J.D., Hill, M.L., Schmidt, M.L., Wilkins, A.K. and E.L. Bradbury. (1979). The hypolipidemic activity of chitosan and other polysaccharides in rats. Vol. 20. No. 5. Nov. pp. 677-684.

Perceval, P.M. (1977). The economics of chitin recovery and production. In. Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan. Muzzarella, R.A.A., E.R. Pariser. ed., Cambridge, Mass. pp. 45-63.

Rha, C.K. (1984). Chitosan as a biomaterial. In. Biotechnology of Marine Polysaccharides. (Rep. MIT-Sea Grant Program) pp. 177-189.

Rendina, G. Ph. D., (1971). Experimental methods in modern biochemistry. Sanders Co. Philadelphia, Pa. U.S.A. pag. 333.

Reynaga, R.A. (1979). Camarón y algo más. Técnica Pesquera. No. 138. Año XII. julio.

Rinaudo, M. and A. Domard. (1988). Solution properties of chitosan. In Proc. Fourth Int. Conf. on Chitin/Chitosan. pp. 71-86.

Sandford, P.A. (1988). Chitosan. Commercial uses and potencial applications. In. Proc. Fourth Int. Conf. on Chitin/Chitosan. pp. 51-69.

Secretaría de Pesca. (1987). Pesquerías Mexicanas. Estrategias para su administración.

Secretaría de Pesca. Principales especies en B.C. (1993). Delegación Federal de Pesca en el Edo. de B.C. Informe elaborado por Ma. Elena Hernández F.

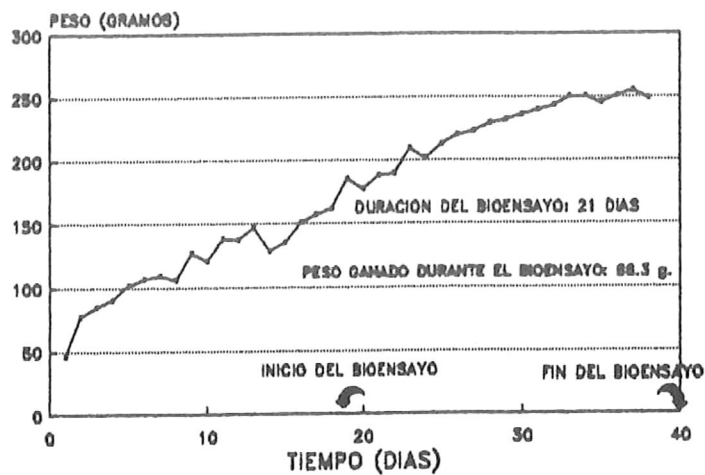
Sugano, M., Fujikawa, T., Hiratsuji, Y., Nakashima, K., Fukuda, N. and Y. Hasegawa. (1980). A novel use of chitosan as a hypocholesterolemic agent in rats. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 33. April. pp. 787-793. USA.

Sugano M., Watanabe, S., Kishi, A., Izume, M. and A. Ohtakara. (1988). Hypocholesterolemic action of chitosans with different viscosity in rats. *Lipids*. 23, 187-191.

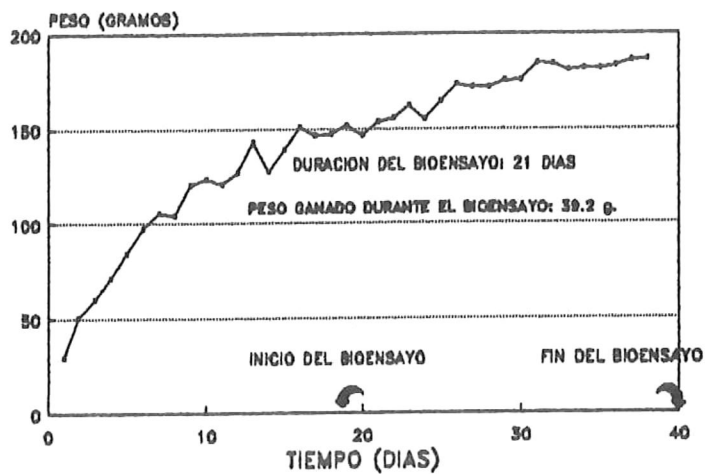
Sung-Koo, K. and C. Rha. (1988). Chitosan for the encapsulation off mammalian cell culture. In. Proc. Fourth Int. Conf. on Chitin/chitosan. pp. 617-626.

Wu, A.C.M. and Bough, (1977). Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan. MIT-Sea Program, Cambridge Mass. pp. 88-102.

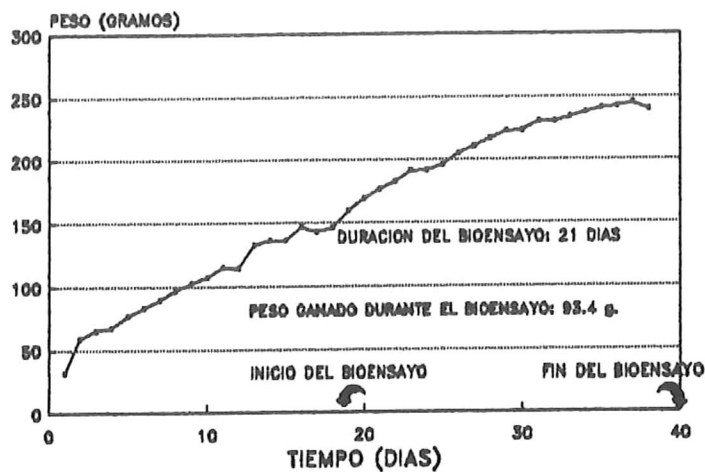
ANEXO I



A. RATA #1. DIETA-BASAL.

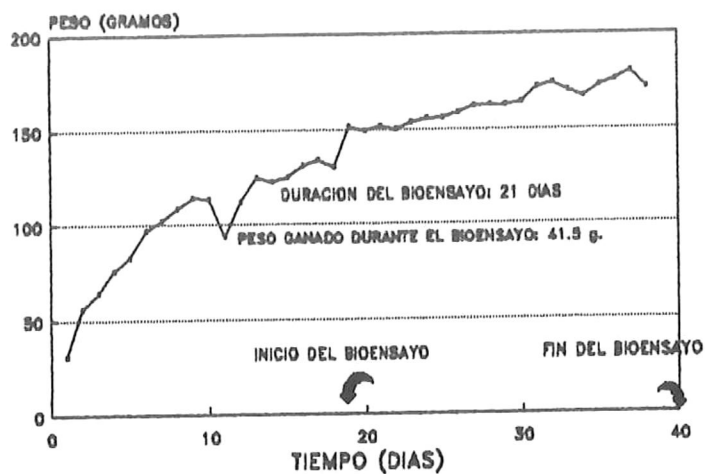


B. RATA #2. DIETA BASAL.

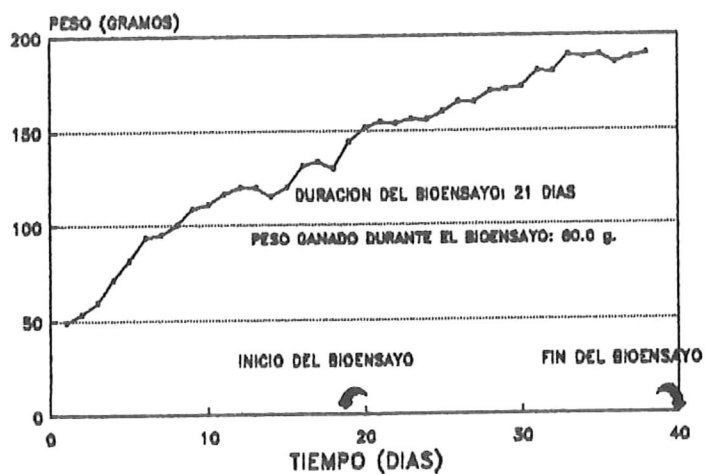


C. RATA #3. DIETA BASAL.

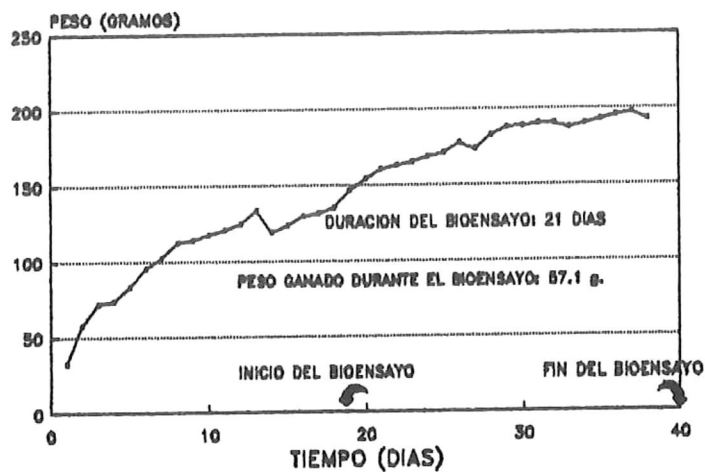
Fig. 1. Evolución del peso (g.) de cada animal de experimentación durante el tiempo de acondicionamiento y desarrollo del bioensayo.



D. RATA #4. DIETA BASAL.

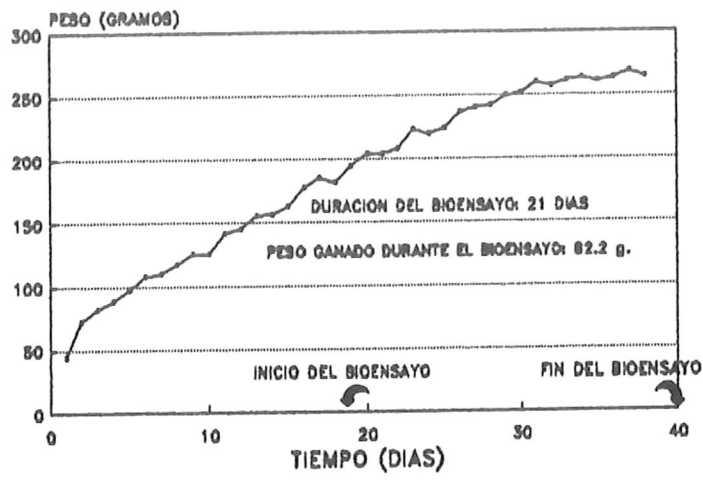


E. RATA #5. DIETA BASAL.

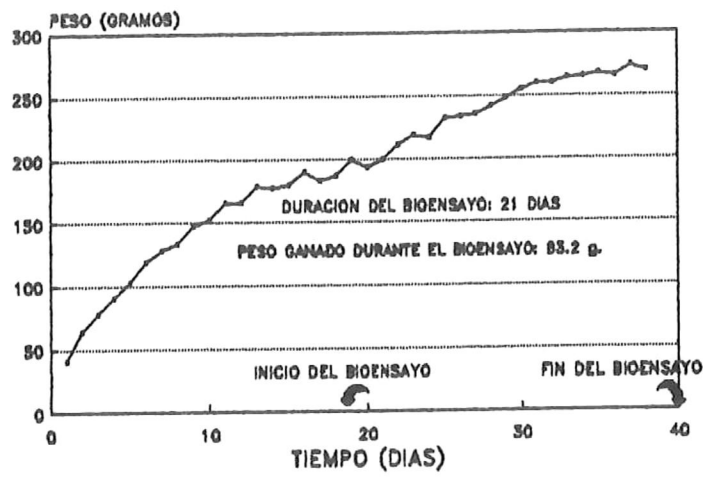


F. RATA #6. DIETA BASAL.

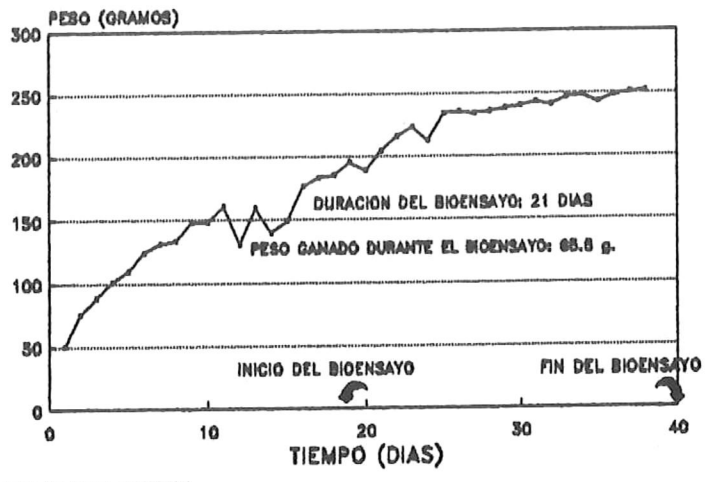
Fig. 1. Evolución del peso (g.) de cada animal de experimentación durante el tiempo de acondicionamiento y desarrollo del bioensayo (...continuación).



A. RATA β 7. DIETA-QUESTRAM.

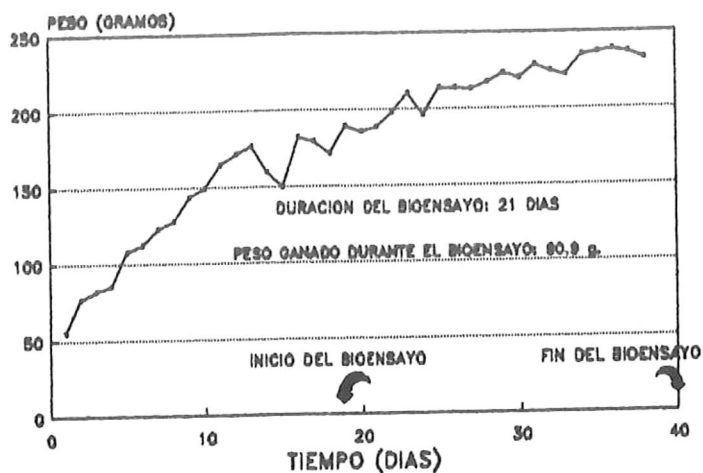


B. RATA β 8. DIETA-QUESTRAM.

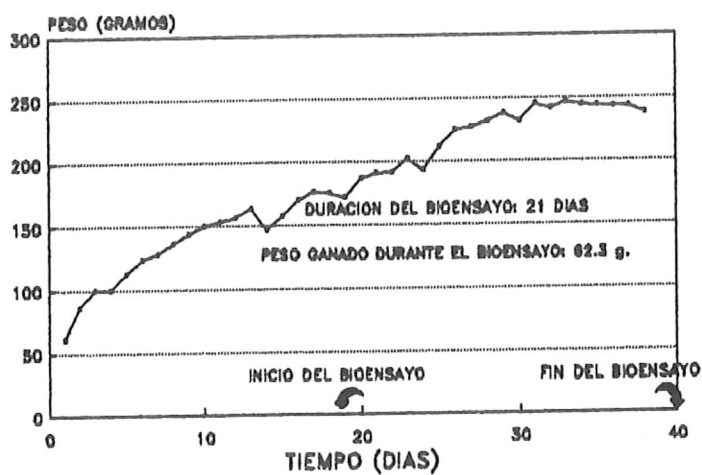


C. RATA β 9. DIETA-QUESTRAM.

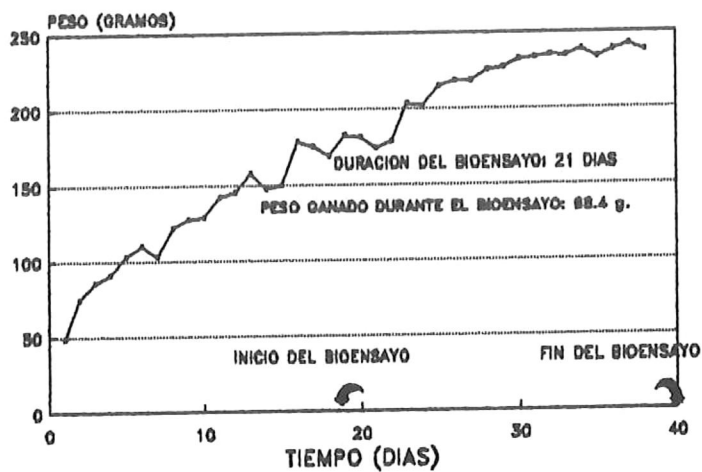
Fig. 1. Evolución del peso (g.) de cada animal de experimentación durante el tiempo de acondicionamiento y desarrollo del bioensayo (...continuación).



D. RATA #10. DIETA-QUESTRAN.

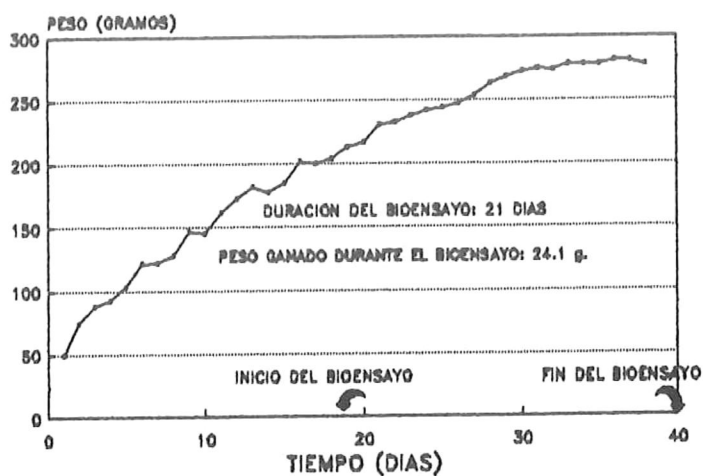


E. RATA #11. DIETA-QUESTRAN.

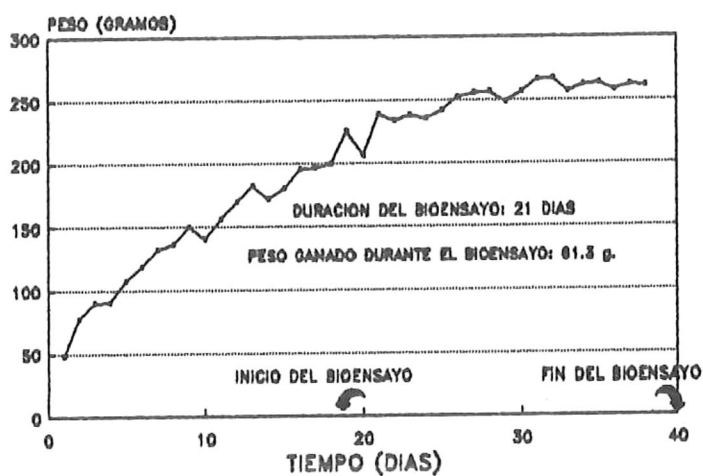


F. RATA #12. DIETA-QUESTRAN.

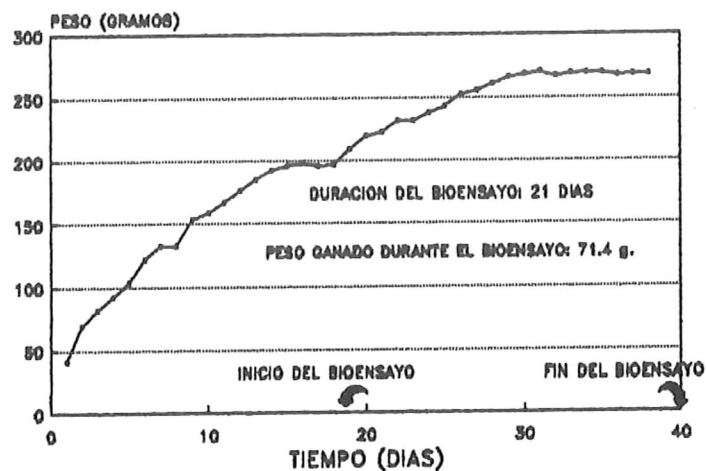
Fig. 1. Evolución del peso (g.) de cada animal de experimentación durante el tiempo de acondicionamiento y desarrollo del bioensayo (...continuación).



A. RATA #13. DIETA-GUTOSAN.

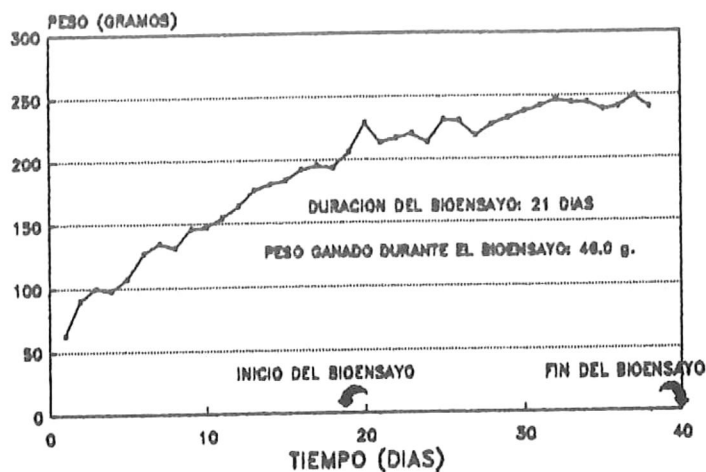


B. RATA #14. DIETA-GUTOSAN.

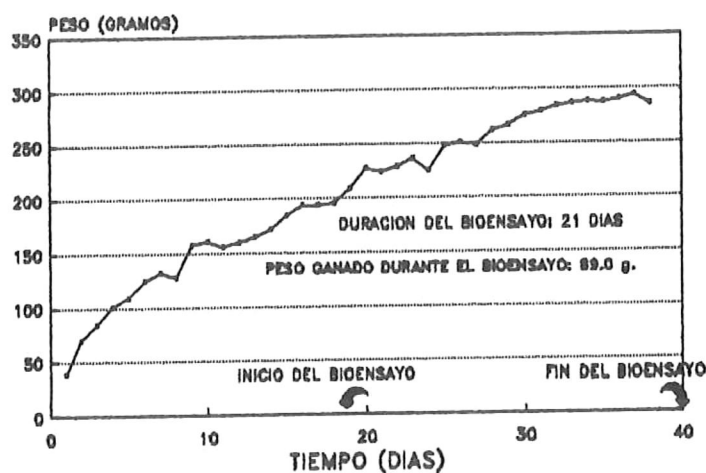


C. RATA #15. DIETA-GUTOSAN.

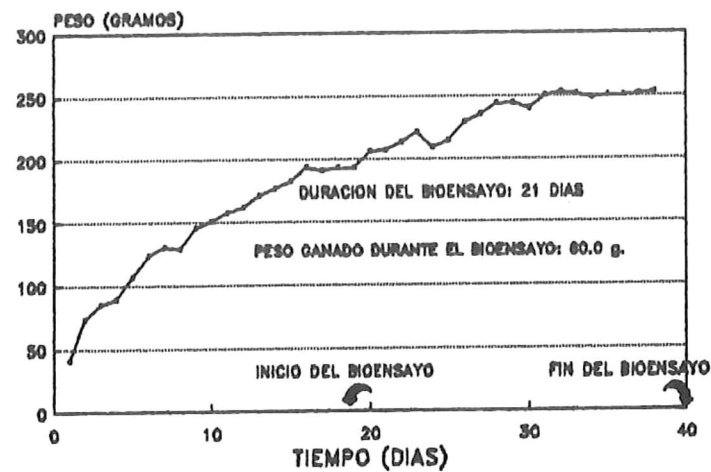
Fig. 1. Evolución del peso (g.) de cada animal de experimentación durante el tiempo de acondicionamiento y desarrollo del bioensayo (...continuación).



D. RATA #16. DIETA-QUITOSAN.

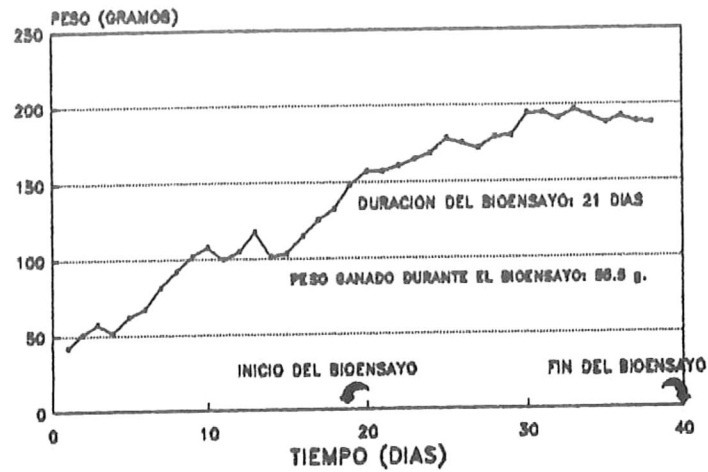


E. RATA #17. DIETA-QUITOSAN.

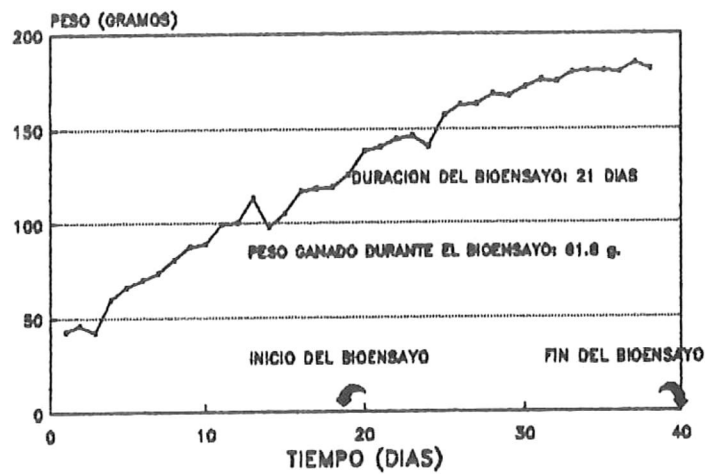


F. RATA #18 DIETA-QUITOSAN.

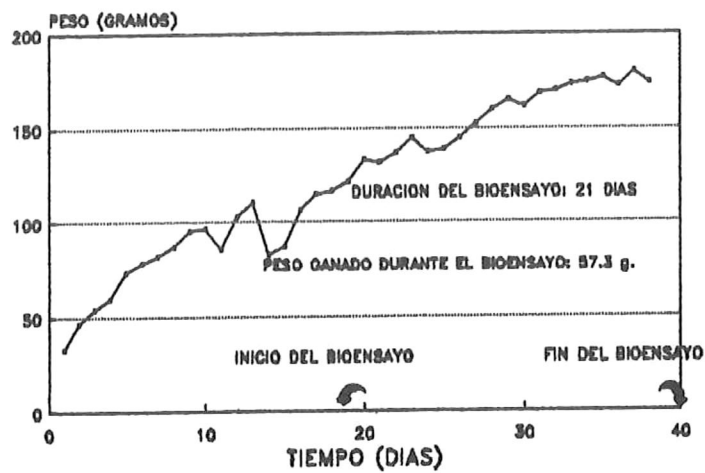
Fig. 1. Evolución del peso (g.) de cada animal de experimentación durante el tiempo de acondicionamiento y desarrollo del bioensayo (...continuación).



A.- RATA #18. DIETA-COLESTEROL

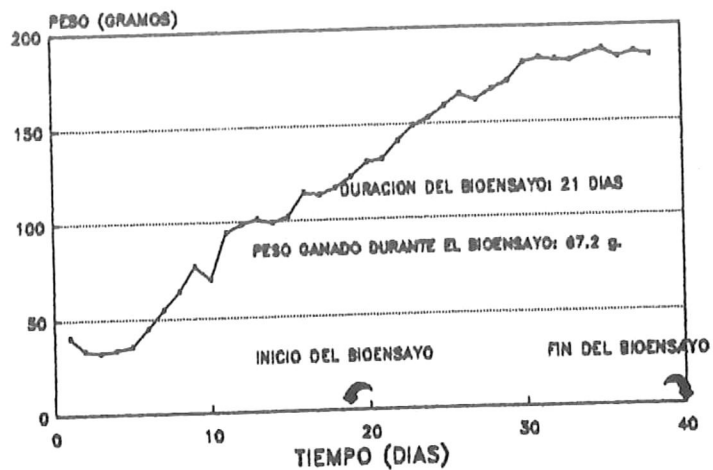


B. RATA #20. DIETA-COLESTEROL

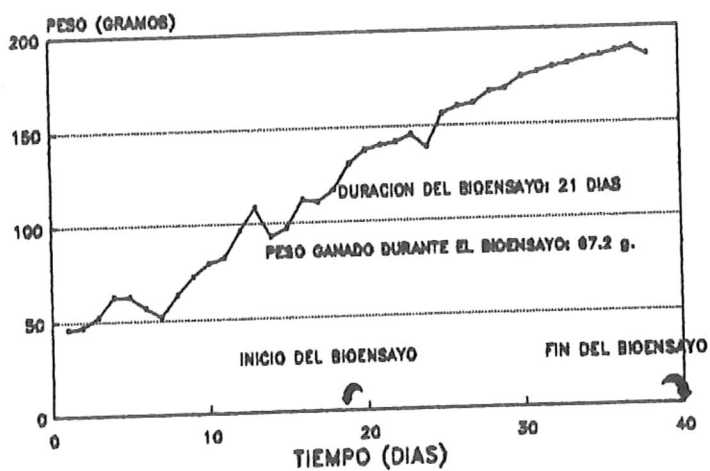


C. RATA #21 DIETA-COLESTEROL

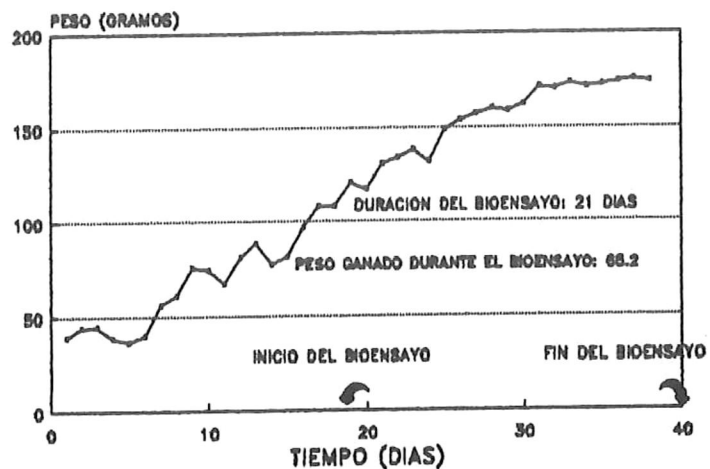
Fig. 1. Evolución del peso (g.) de cada animal de experimentación durante el tiempo de acondicionamiento y desarrollo del bioensayo (...continuación).



D. RATA #22. DIETA-COLESTEROL



E. RATA #23. DIETA-COLESTEROL



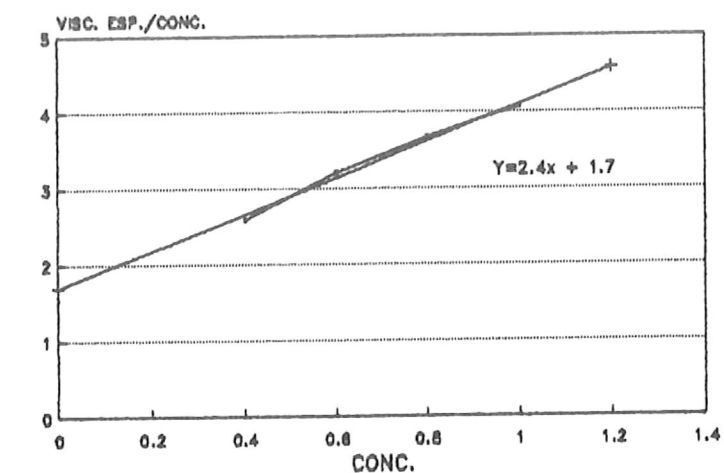
F. RATA #24. DIETA-COLESTEROL

Fig. 1. Evolución del peso (g.) de cada animal de experimentación durante el tiempo de acondicionamiento y desarrollo del bioensayo (...continuación).

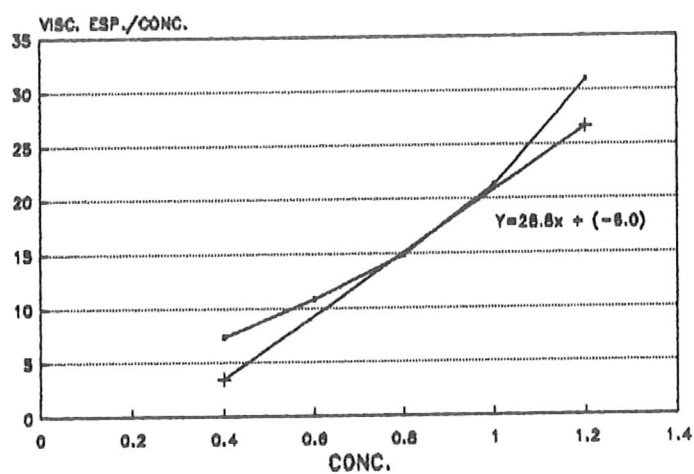
ANEXO II

TABLA I. Pesos de los hígados correspondientes a cada organismo de prueba.

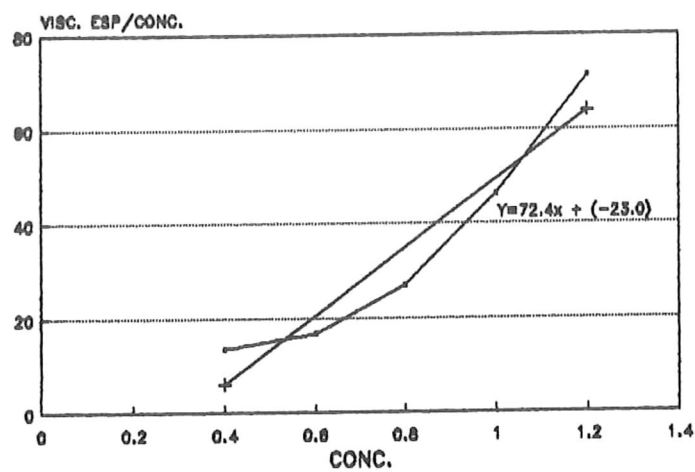
	CONTROL Dieta Basal	TESTIGO Dieta-Questran	GRUPO #1 Dieta-Quitósán	GRUPO #2 Dieta-Colesterol
PESO HIGADO (grs.)	9.4	11.9	8.9	9.7
	9.3	9.0	7.4	8.1
	9.9	9.7	8.7	6.4
	7.5	7.5	6.4	7.3
	7.5	7.7	6.8	8.1
	9.4	9.5	6.8	7.4



1. LOTE #1



2. LOTE #8



3. LOTE #8A

Fig. 1. Gráficas de viscosidad específica entre la concentración en función de la concentración para cada uno de los lotes de quitosán y su correspondiente ecuación de la recta, donde se muestran los valores de viscosidad intrínseca (ordenada al origen).

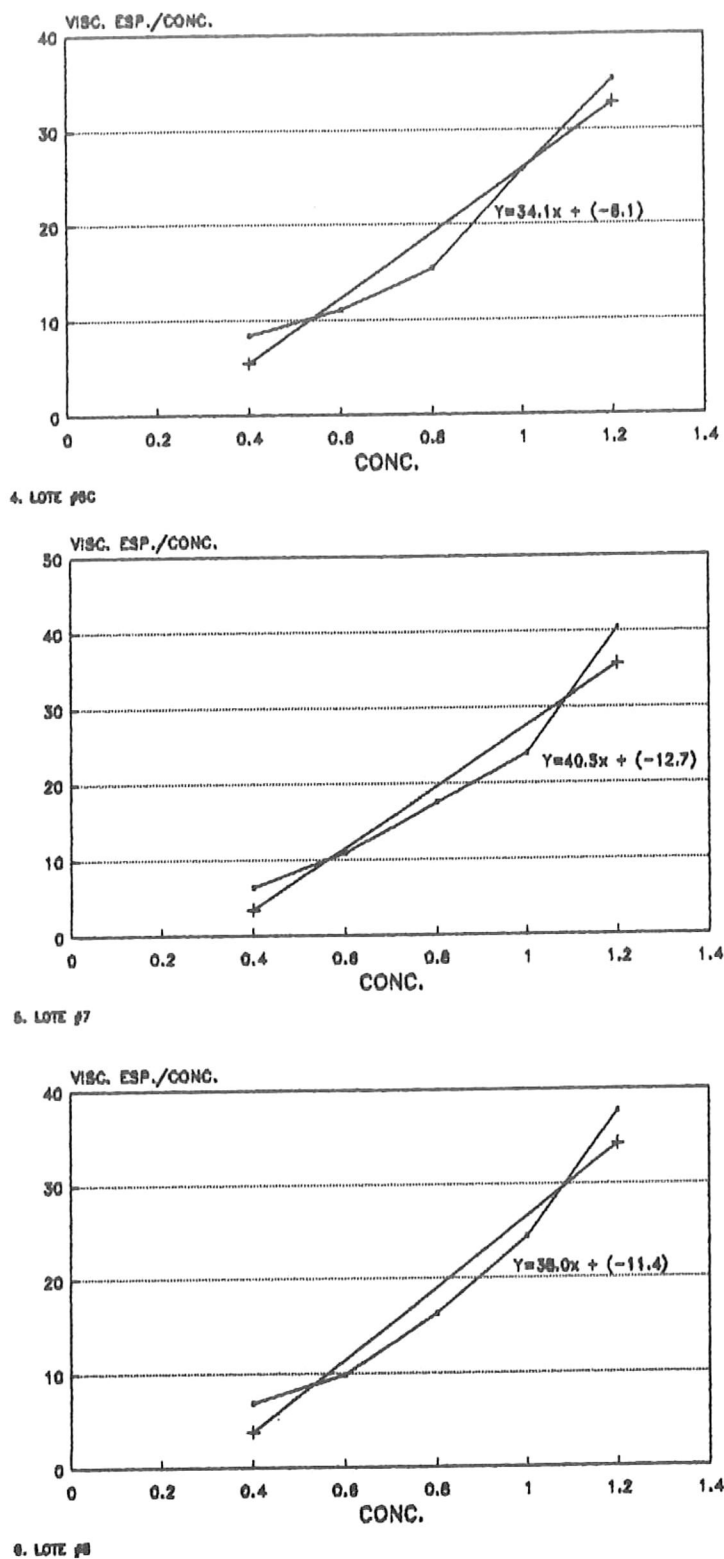


Fig. 1. Gráficas de viscosidad específica entre la concentración en función de la concentración para cada uno de los lotes de quitosán y su correspondiente ecuación de la recta, donde se muestran los valores de viscosidad intrínseca (ordenada al origen) (...continuación).

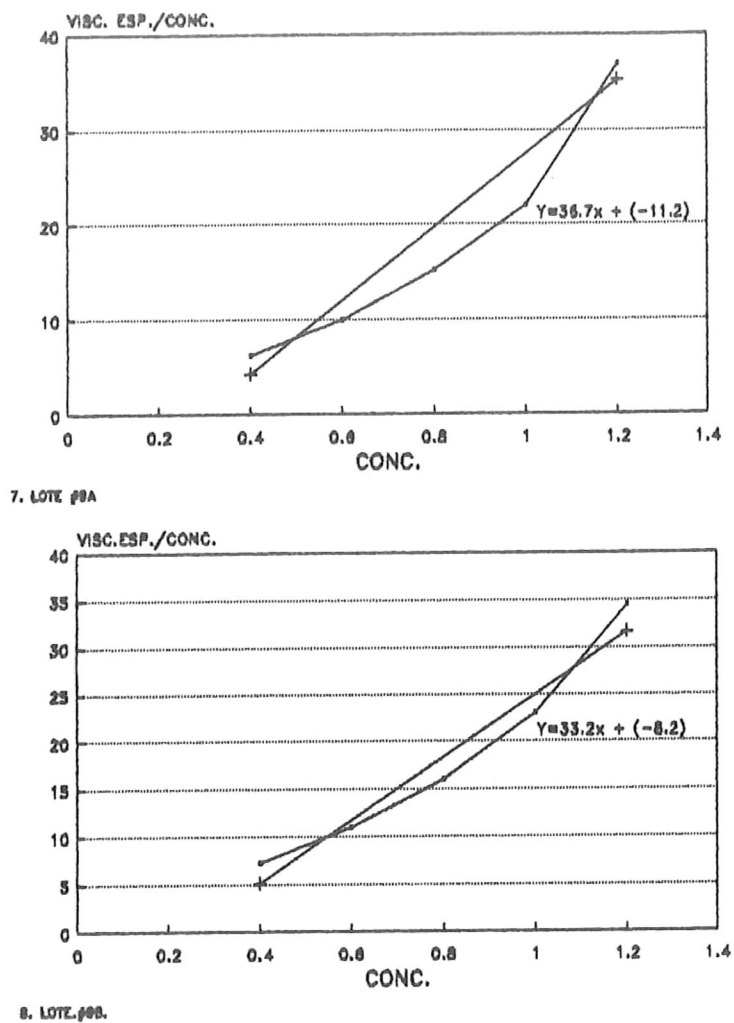


Fig. 1. Gráficas de viscosidad específica entre la concentración en función de la concentración para cada uno de los lotes de quitosán y su correspondiente ecuación de la recta, donde se muestran los valores de viscosidad intrínseca (ordenada al origen) (...continuación).