

Estudio de la Viabilidad Técnica de la Extracción de Ácido Hialurónico y Colágeno de la Membrana Testácea y las Cáscaras de Huevo en el Municipio de Aguachica-Cesar

Autores

Luis Alfredo Cárdenas Cabrales

Saide Marcela Chinchilla Niz

Universidad Popular del Cesar (UPC)

Seccional Aguachica

Facultad de Ingenierías y Tecnológicas

Ingeniería Agroindustrial

Aguachica- Cesar, Colombia

11 de junio de 2025

Estudio de la Viabilidad Técnica de la Extracción de Ácido Hialurónico y Colágeno de la Membrana Testácea y las Cáscaras de Huevo en el Municipio de Aguachica-Cesar

Autores

Luis Alfredo Cárdenas Cabrales

Saide Marcela Chinchilla Niz

Monografía presentada como requisito para optar al título de **Ingenieros Agroindustriales**

Directora

Maria Del Mar Prieto Manosalva

Codirector

Fabian Armando Barbosa Páez

Universidad Popular del Cesar (UPC)

Seccional Aguachica

Facultad de Ingenierías y Tecnológicas

Ingeniería Agroindustrial

Aguachica- Cesar, Colombia

11 de junio de 2025

RESUMEN

Esta investigación tiene como objetivo evaluar la viabilidad técnica de la extracción de ácido hialurónico y colágeno a partir de las cáscaras y la membrana testácea del huevo en el municipio de Aguachica, Cesar. El estudio se justifica por la alta generación de residuos de huevo en panaderías y reposterías locales, lo que representa un desafío ambiental pero también una oportunidad dentro de un enfoque de economía circular. Se realizó una caracterización en cuatro establecimientos, donde se pudo confirmar la gran cantidad de este residuo generado en la región, lo que evidencia un potencial significativo como materia prima. La metodología incluyó el tratamiento físico y químico de las cáscaras y membranas para extraer los compuestos objetivo mediante procesos como hidrólisis ácida y filtración. Los resultados más relevantes confirmaron la presencia de colágeno y ácido hialurónico en cantidades medibles, lo que demuestra la viabilidad de estos residuos como fuente sostenible para la producción de biocompuestos utilizados en las industrias cosmética y farmacéutica. Se concluye que las cáscaras de huevo y sus membranas, actualmente consideradas residuos, pueden transformarse en insumos valiosos, promoviendo la innovación, la sostenibilidad ambiental y el desarrollo local. El principal logro fue demostrar la posibilidad de integrar los residuos de la industria alimentaria local en cadenas de valor basadas en procesos biotecnológicos.

Palabras clave: cáscaras, membrana testácea, extracción, colágeno, ácido hialurónico.

FORMATO No. 3 MONOGRAFÍA

TÍTULO

Estudio de la viabilidad técnica de la extracción de ácido hialurónico y colágeno de la membrana testácea y las cáscaras de huevo en el municipio de Aguachica-Cesar

1. INTRODUCCIÓN:

A lo largo de la historia, la gallina doméstica (*Gallus gallus domesticus*) ha sido una de las principales especies aviares domesticadas por su relevancia en la alimentación humana. Entre los productos derivados de esta especie, el huevo destaca como uno de los alimentos más nutritivos y ampliamente consumidos a nivel mundial. El continente con mayor consumo anual per-cápita en huevo, fue el este de Asia Oriental el cual posee un margen de ingesta que supera los 350 huevos anuales por persona. Sin embargo, este fenómeno no es exclusivo de Asia; en Colombia, el consumo de huevo varía (Ricardo & Vergara, 2020). Según datos extraídos de FENAVI, en el 2020 el consumo de unidades por año fue de 326, en el 2021 fue de 335, en el 2022 fue de 317 y en el 2023 fue de 324 (FENAVI, 2022). Estas cifras catalogan al país como el segundo consumidor más alto del planeta, solo por debajo de México (Ricardo & Vergara, 2020).

El huevo de gallina (*Gallus gallus domesticus*) es uno de los alimentos de mayor consumo en el mundo, siendo Colombia uno de los tres países con mayor consumo en latino América con un consumo de 323 unidades, en el puesto número 1 y 2 tenemos a México con 392 y argentina con 336 unidades anuales (Polastri et al., 2024). De acuerdo con los datos proporcionados por la Federación Nacional de Avicultores FENAVI, el consumo de este producto alimenticio ha mostrado un crecimiento significativo en el país (Bedoya-Salazar & Valencia-González, 2020). Según información obtenida de FENAVI, la producción de huevos de gallina de referencia AA tuvo un aumento significativo desde 2017 hasta 2023. En 2017, se produjeron 111.0 millones de

unidades, y para el año 2023, la producción alcanzó los 150.0 millones, los cuales fueron distribuidos a mercados mayoristas.

La domesticación aumentó la cría de gallinas y como resultado de esto los residuos de cáscaras de huevo, un subproducto que a menudo termina en los vertederos, donde se incrementan los problemas de gestión de residuos a nivel global (Ricardo & Vergara, 2020). Con el paso del tiempo estos residuos han experimentado una amplia variedad de usos caseros (Bedoya-Salazar & Valencia-González, 2020). En la cultura china adquieren el calcio al colocar las cáscaras en jugo de limón, seguidamente se le agregan otros jugos, previo a su utilización se limpian y esterilizan por medio de procesos térmicos cortos para descartar la presencia de agentes infecciosos. En Colombia el aprovechamiento de este residuo de cáscara de huevo comúnmente radica en la elaboración de abono en la comunidad campesina o también de forma casera, en algunos lugares también son utilizadas para la fabricación de filtros tradicionales en la descontaminación del agua (Bedoya-Salazar & Valencia-González, 2020).

Al obtener una mayor producción de huevos de gallina se generará una gran cantidad de cáscara en cantidades que comúnmente van a parar a los vertederos o rellenos sanitarios, estos residuos orgánicos han sido catalogados en el puesto número cinco de los más contaminantes de la industria alimentaria según resultados de las encuestas de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA). Por otra parte, están considerados como una fuente importante de la contaminación ambiental cuando no se procesan o se desecha adecuadamente, por lo que provoca un gran peligro a largo plazo debido al gran incremento de hongos y microorganismos perjudicial para la salud, además es un foco de atracción para las ratas y otros vectores (Beltrán, 2021).

Las cáscaras de huevo generan un impacto negativo en el medio ambiente, especialmente cuando no se cuenta con un proceso adecuado para su disposición. Estos residuos orgánicos

contribuyen a la contaminación del suelo y de las aguas subterráneas en los vertederos sanitarios (Cabrera-Estrada & Iglesias-Barreto, 2024).

En este contexto, el departamento del Cesar, la producción de pollos se mantuvo estable a nivel Nacional entre 2015 y 2021, con oscilaciones alrededor del 0,5%. En los años 2019 y 2021 registraron la mayor participación, alcanzando el 0.61% en el 2021. En cuanto a la producción de huevos, la participación del Cesar mostró una tendencia al alza, pasando del 0.14% en 2015 al 0.31% en 2020. Entre 2016 y 2021, la tasa de crecimiento anual de la producción de huevo presentó picos de crecimientos más significativos que los decrecimientos, alcanzando 39.39% en 2018 y el 69,76% en 2020. Finalmente, en el 2021, la tasa de crecimiento se desaceleró al 2.05% (FENAVI, 2022). Por otra parte, según el Censo Avícola realizado por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), en el Cesar se registraron 56 granjas avícolas. De estas, 36 (64.29%) se dedican al engorde y 20 (35.71%) a la producción de huevos. Los municipios con mayor número de granjas son Valledupar, con 11 (19,64%); Manaure, con 10 (17,86%); La Paz, con 6 (10,71%); y San Alberto, con 3 (5,36%) (FENAVI, 2022).

En el municipio de Aguachica, el cual está ubicado al sur del departamento del Cesar, los residuos orgánicos, como la cáscara de huevo, son generados principalmente por panaderías, reposterías y hogares. Esto resalta el alto consumo como producto de la canasta familiar. Uno de los principales motivos del incremento de estos residuos orgánicos es el crecimiento de la población en la región, Aguachica es uno de los 25 municipios del departamento del Cesar, que cuenta con 128.425 habitantes, el cual 65.702 mujeres (51.2%) y 62.723 hombres (48.8%). El cual representa el 9.25 de la población total del Cesar (Telencuesta, s.f.) . el cual nos indica un incremento en la demanda de alimentos. En el caso de las panaderías, este aumento se debe a la mayor producción de productos panificados, mientras que en las reposterías se debe al incremento de pedidos de tortas y postres. Para poder estimar la cantidad de cáscaras de huevo

desechadas por cada uno de estos lugares, se calcula la cantidad de productos utilizados semanalmente.

La estructura que compone principalmente al huevo está constituida por la cáscara, cuya composición es mayoritariamente de un mineral de tipo calcita. Además, posee una membrana interna compuesta por colágeno y glicoproteínas entrelazadas. La función principal de esta estructura es permitir el intercambio de líquidos y gases entre el interior del huevo y el ambiente (Bibiana, 2023).

En este sentido, la cáscara de huevo representa entre el 10% y el 12% del peso total del huevo. Está, a su vez, está compuesta de un 95% por minerales, principalmente carbonato de calcio, y entre un 3,05% y un 3,5% por compuesto orgánicos, incluyendo proteoglicanos y proteínas como la ovoalbúmina (116 kDa, 32 kDa, 17 kDa), osteopontina (OPN) y lisozima. Cabe destacar que estas proteínas juegan un papel fundamental en la formación de cristales de calcita. Además, en la parte interna poseen una capa de queratina y fibra de colágeno, conocida como membrana testácea (Bedoya-Salazar & Valencia-González, 2020).

Por otro lado, la membrana de la cáscara del huevo es rica en colágeno, ácido hialurónico, condroitina, glucosamina, queratina y lisozima. Estos componentes, a su vez, se encargan en la activación del desarrollo de los fibroblastos que se encuentran presentes en la piel, estos son los encargados de la producción de colágeno tipo III (Pizarro, 2020).

En cuanto a sus aplicaciones, el ácido hialurónico es un ingrediente activo ampliamente utilizado para la hidratación en formulaciones cosméticas. Se encuentra presente en productos que ayudan a restaurar, la hidratación y a dar elasticidad de la piel. De esta manera, los productos a los cuales se les puede implementar son las cremas, geles, emulsiones y sueros. De esta manera, la principal función en la aplicación es la creación de un film viscoelástico. El cual actúa como una barrera protectora que previene la penetración y filtración de sustancias extrañas, lo que, a su

vez, permite mantener la humedad necesaria en la piel. Sin embargo, su eficacia en cuanto a su función y eficiencia de hidratación va a depender de la mayor cantidad de peso molecular que este posea, a menor peso molecular mayor será la penetración en la capa dérmica, lo cual facilita el restablecimiento de ácido hialurónico también aumenta (Chávez Feijoó, 2021).

Por otra parte, el colágeno es uno de los productos que se utiliza ampliamente en la industria cosmética, gracias a sus propiedades filmógenas, que al estar en contacto directamente con la superficie de la piel es capaz de crear una capa protectora capaz de protegerla de elementos corrosivos y a la vez nos ayuda a disminuir la pérdida de agua transepidérmica, esta es la principal razón por la cual se aplica en cremas y geles con altos niveles de hidratación (Chávez Feijoó, 2021).

En este contexto, y considerando el creciente interés por el aprovechamiento de subproductos agroindustriales. El presente análisis se centrará en la extracción de ácido hialurónico y el colágeno a partir de las cáscaras de huevo de gallina. Este estudio buscará desarrollar soluciones que no solo sean innovadoras, sino también sostenibles y económicamente viables.

Existen varios métodos para la extracción de ácido hialurónico y colágeno a partir de las cáscaras de huevo, que se describen a continuación:

Medios de separación de la membrana testácea y las cáscaras: En los procesos de separación de las membranas de la cáscara de huevo existen tres métodos: La separación física por diferencia de densidades utiliza un tanque con agua y hélices que generan una turbulencia, haciendo que las membranas permanezcan en la superficie, mientras que las cáscaras se depositan en el fondo del tanque (Chávez Feijoó, 2021). La solución de EDTA emplea un equipo de separación con agitación y separación concéntrico, mezclando las cáscaras con EDTA 0.5 M a 50 rpm lo que provoca la precipitación de las cáscaras y flotación de las membranas, posteriormente se

recogen en un tamiz (Chávez Feijoó, 2021). Por otro lado, la separación química por disolución de fase mineralizada es un método que utiliza ácido como HCl, ácido acético o EDTA para disolver el carbonato de calcio (CaCO_3) que compone la cáscara de huevo. Bajo condiciones ácidas, la disolución rompe la barrera fuertemente unidad, liberando la membrana de la cáscara. Este método es efectivo para separar las membranas de las cáscaras de huevo utilizado en combinación con otros métodos (Chávez Feijoó, 2021).

Medios de extracción: Dentro de los métodos de extracción de colágeno de cáscaras de huevo existen varios procesos, los cuales son: hidrólisis enzimática con TanG Plus (3%); hidrólisis ácida con ácido clorhídrico (HCl) o ácido acético (AcOH); precipitación salina con cloruro de sodio (12%); extracción con pepsina; y extracción básica con hidróxido de sodio. La extracción química, por su parte, consiste en tomar una cantidad determinada de cáscara de huevo, a la cual se le añade una solución de NaCl 0,2%. La mezcla se deja reposar y luego se somete a un proceso de centrifugación a una velocidad y tiempo determinado. Este proceso se repite cuatro veces utilizando diferentes reactivos como: cloruro de calcio, etanol y dimetilcetona. Finalmente, la solución obtenida se deja reposar y se almacena en refrigeración. Estos métodos varían en pH, temperatura, tiempo y concentración de reactivos, y tienen como objetivo disolver el colágeno y separarlo de otras proteínas y componentes (Cobeñas-Dueñas, 2022).

Partiendo de lo mencionado anteriormente y con el fin de encontrar una solución para este importante residuo, el objetivo principal de este estudio es extraer ácido hialurónico y colágeno de las cáscaras de huevo. Para posteriormente explorar las propiedades y beneficios de su aprovechamiento, con el propósito de agregar valor a este desecho orgánico y reducir el impacto ambiental de su descomposición. La investigación se enfocará en la extracción de ácido hialurónico y colágeno a partir de la cáscara y la membrana testácea del huevo, utilizando un método de extracción en el laboratorio de la Universidad Popular del Cesar

Pregunta problema:

¿Qué tan viable puede llegar a ser la extracción de ácido hialurónico y colágeno a base de las membranas testáceas y las cáscaras de huevo, de acuerdo con un método de extracción seleccionado?

1.1. OBJETIVOS:**Objetivo general**

Estudiar la viabilidad técnica de la extracción de ácido hialurónico y colágeno de la membrana testácea y las cáscaras de huevo en el municipio de Aguachica-Cesar.

Objetivos específicos

Caracterizar preliminarmente la generación de residuos de cáscara de huevo en una muestra de panaderías y reposterías del municipio de Aguachica, Cesar.

Analizar comparativamente métodos de extracción de colágeno y ácido hialurónico a partir de las cáscaras y la membrana testácea del huevo.

Evaluar la efectividad técnica del método seleccionado para la extracción de ácido hialurónico y colágeno.

1.2. MARCO TEÓRICO**1.2.1 Ácido hialurónico (AH) y colágeno**

El ácido hialurónico es un glucosaminoglicano formado por unidades repetidas de ácido urónico y N-acetil-D-glucosamina. Esta partícula posee la habilidad de conservar bastantes volúmenes de agua, lo cual la hace necesaria para preservar la humectación y formación de los tejidos. El ácido hialurónico se expande por varias zonas del cuerpo, incluyendo la piel. Con el paso de los años, es difícil generar ácido hialurónico por lo que es crucial suministrarlo al cuerpo por medio de otras fuentes favoreciendo la elasticidad y estabilidad de la piel (Clinica Universidad de Navarra, 2023).

Por su parte, el colágeno es un componente proteico que tiene la funcionalidad de retener juntas la variedad de estructuras del ser vivo. Es elaborada por los fibroblastos, siendo la más exuberante en el cuerpo denotando el 25% de la totalidad en los adultos. Con el paso del tiempo, la generación de colágeno disminuye, el cual mantiene juntos los tejidos conectivos. La mezcla de colágeno y AH da resultados favorables sobre articulaciones y músculos (Valera, 2024)..

1.2.2 Fuentes comunes de extracción de Ácido hialurónico y colágeno

Colágeno. El colágeno es una proteína que tiene como función mantener unidas las diferentes estructuras del organismo. El colágeno es ampliamente utilizado en la industria de la belleza y la salud (Valera, 2024).. Sus principales fuentes de extracción son:

origen animal

Bovinos: en los bovinos el colágeno es principalmente extraído de la piel, tendones y huesos. El colágeno extraído se usa en la elaboración de gelatina aplicada en diversos campos.

Porcinos: en los cerdos el colágeno se extrae principalmente de la piel y los huesos. El colágeno extraído se aplica en diferentes suplementos alimenticios y áreas de la belleza.

Especies marinas: el colágeno de estas especies se extrae de la piel, las escamas y las espinas, es usado en la cosmetología por su rápida absorción (lafarmacia.es , 2018).

Ácido hialurónico. El ácido hialurónico es un polisacárido esencial en la hidratación y elasticidad de la piel, asimismo en la lubricación de las articulaciones (Clinica Universidad de Navarra, 2023)

Origen animal

Tejido de cresta de gallo: la cresta de gallo posee un alto contenido de ácido hialurónico, siendo eficaz en productos corporales y tratamientos médicos (Glòria Bernal1, 2018).

Las cáscaras de huevo: son una fuente de extracción de Ácido hialurónico, ya que las cáscaras poseen una estructura orgánica nutrida en este ácido (Comisióm Europea , 2024)..

1.2.3 Las membranas testáceas y cáscaras de huevo fuente de AH y colágeno

La estructura principal del huevo está constituida por la cáscara, la cual su composición principal es un mineral de tipo calcita. También posee una membrana interna compuesta por colágeno y glicoproteínas entrelazadas, la función principal de esta estructura es el poder permitir los intercambios de los líquidos y los gases internos con el ambiente (Casiano, García, García & Pérez, 2023). En cuanto a su composición, la cáscara de huevo está constituida del 10 al 12% de su peso. El cual está compuesta de un 95% de minerales y un 3.05% a un 3.5% de compuesto orgánicos, proteoglicanos y proteínas como la ovoalbúmina 116, ovoalbúmina 32, ovoalbúmina 17, osteopontina (OPN) y lisozima, los cuales interfieren en la formación de cristales de calcita. En la parte interna, poseen una capa de queratina y fibra de colágeno, conocida como membrana testácea (Bedoya-Salazar & Valencia-González, 2020).

La membrana de la cáscara del huevo es rica en colágeno, ácido hialurónico, condroitina, glucosamina, queratina y lisozima. Los cuales son componentes que se encargan en la activación del desarrollo de los fibroblastos que se encuentran presentes en la piel, estos son los encargados de la producción de colágeno tipo III (Pizarro, 2020). Según la investigación realizada por Garima Kulshreshtha, Ty Diep, Helen-Anne Hudson y Maxwell T Hincke en el 2022, sobre las aplicaciones de alto valor y mercado comercial actual para membranas de cáscara de huevo y bioactivos derivados, aunque las membranas de las cáscaras de huevo contienen bioactivos significativos, suelen denominarse un subproducto no aprovechado en la industria de la avicultura, con un reporte global alrededor de 9 millones de Ton anualmente (Kulshreshtha et al., 2022). Sin embargo, las membranas testáceas del huevo tienen la capacidad de separarse fácilmente de los residuos de cáscaras de huevo producidas por la industria avícola, lo que las hace biomateriales beneficiosas y equilibradas (Mensah et al., 2023).

Actualmente, las cáscaras se denominan desechos contaminantes del entorno no usadas

correctamente. Varios investigadores llevaron a cabo la elaboración de un spray facial a base de las membranas del huevo, con el fin de prevenir o mitigar los daños en la piel, esto gracias a sus componentes bioactivos. En la elaboración de este producto, se llevaron a cabo diversos planteamientos de spray facial de colágeno haciendo uso de la membrana testácea, combinada con soluciones como agua destilada y glicerina. Se realizaron pruebas de anatomía patológica con tinción de sirio red y microscopía, dando como resultado un aproximado de 52,8% de colágeno. Además, se realizaron pruebas de pH, organolépticas y de humedad corporal en los diferentes planteamientos, resultando en uno de los planteamientos un pH de 5,4 considerándose apto para la piel. Respecto a las pruebas organolépticas, se notó que cada una de las muestras conservaban cualidades como el olor, color y homogeneidad mientras estaban en área de almacenamiento o reposo. Para la prueba de humedad corporal, se hizo uso de un medidor de humedad, dejando apreciar un incremento de la humedad corporal luego de la aplicación del spray facial de colágeno (Agustin et al., 2022).

En una investigación sobre los efectos de los hidrolizados de membrana de cáscara de huevo (ESMH) sobre la formación de arrugas inducida por la radiación UVB en ratones sin pelo SKH-1, se demostró lo saludable que pueden ser los ESMH para la piel, gracias a su habilidad para incrementar la elaboración de colágeno y disminuir el daño a causa de los rayos UV. Se realizaron pruebas en ratones sin pelo irradiados con UV para analizar las influencias de los ESMH en su piel. Además, se analizó la expresión génica mediante PCR en tiempo real con el objetivo de medir la expresión de genes vinculados con la producción de colágeno, su deterioro e inflamación en la piel de los ratones a los cuales se les aplicó ESMH. En las pruebas histológicas, realizadas para analizar la diferencia de densidades de fibras de colágeno, se demostró que los hidrolizados de ESMH incrementar la producción de colágeno en las células de fibroblastos dérmicos humanos, contribuyendo positivamente a la elasticidad y disminución de arrugas

corporales. Adicionalmente, poseen compuestos humectantes que incrementan la hidratación corporal (Agustin et al., 2022).

En investigaciones sobre las influencias del ácido retinoico usado para el antienvjecimiento han demostrado que puede tener resultados negativos, como la dermatitis, abriendo puertas al requerimiento de soluciones confiables, como los ESMH (Agustin et al., 2022). En este contexto, la membrana testácea del huevo es un compuesto biológico que ha obtenido cada vez más consideración en el área de la medicina esto gracias a sus características como la versatilidad y sostenibilidad. La membrana testácea es una capa delgada que separa la albúmina del huevo. Dentro de los usos de la ESM están los alimentos funcionales y cosméticos, ya que están formadas por proteínas, minerales y glicosaminoglicano (GAG), los cuales poseen alta capacidad de degradación biológica y aceptación por los tejidos. Según investigaciones actuales se ha evidenciado sus posibles usos en la medicina traslacional, por ejemplo en el saneamiento de heridas, ingeniería de tejidos, medicina regenerativa y fármacos (Mensah et al., 2023).

Mediante el proceso de reticulación, se puede apreciar que la utilización de reactivos químicos reticulantes, específicamente el glutaraldehído y genipina, favorecen la resistencia del ESM, aportando positivamente a la funcionalidad celular y disminución de la toxicidad. Lo que la convierte en una formación apta para sostener la adherencia y crecimiento celular (Mensah et al., 2023). Además, en una investigación realizada por Sweta Sinha, Abhay Kr. Aman, Rakesh Kr. Singh, Nishant Kr y Kumari Shivani sobre la elaboración de nanomateriales a través de bases naturales, como la cáscara de huevo, mediante métodos como la utilización de elementos ayurvédicos como Kukutanda twak Bhasma en la curación de enfermedades y su eficiencia clínica, revela información significativa (Sinha et al., 2020).

Los análisis enfocados en las propiedades físicas y terapéuticas de los nanomateriales,

anexando estructuras y función microbiana a través de pruebas bajo el microscopio y difracción de rayos X, demuestran que los nanomateriales de CaO (Kukutanda twak Bhasma) a base de las cáscaras de huevo poseen un tamaño por debajo de 100 nm. Respecto a las pruebas terapéuticas, el proceso térmico influyó en acciones específicas para la función terapéutica indicando un posible uso como medicina natural alternativa. La nanomedicina KB reveló mayor funcionalidad como representante antimicótico y también demostró acciones magnéticas y luminosas, indicando posibles usos en aparatos magnetópticos y áreas con relación. Los Nanomaterial de óxido de calcio (CaO) (Kukutanda twak Bhasma) de cáscara de huevo tendrían la capacidad de utilizarse en el progreso de nuevas intervenciones terapéuticas o elaboración de equipos biomédicos (Sinha et al., 2020).

Un estudio para el desarrollo de un biomaterial de cáscara de huevo realizado por Nathalia Beltrán Ramírez, Yenny González Fino y Lady Johana Hernández Gómez, acredita la opción de hacer uso de las cáscaras de huevo como suministro de materia prima para la extracción de AH y Colágeno, destacando la relevancia del cuidado necesario de las cáscaras de huevo (Beltrán Ramírez, 2021). La membrana testácea es abundante en AH, colágeno, glucosamina, lisozima, condroitina y queratina, todos estos son bioactivos con características positivas para la curación de heridas y restauración de tejidos. Estos resultados demuestran la importancia de esta materia prima como un recurso valioso de biomoléculas. Además, las investigaciones realizadas demuestran la factibilidad técnica de hacer uso de las membranas de cáscaras de huevo en la biomédica, como en la elaboración de vendajes para heridas (Pizarro, 2020)

Así mismo, un estudio realizado por la Dra. María José Cao Torija sobre la eficacia de los suplementos de colágeno y ácido hialurónico en la salud de la piel y el aparato locomotor se demostró la eficacia de los suplementos nutricionales de colágeno hidrolizado, especialmente

cuando es mezclado con otras sustancias como el AH y vitamina C. Fue notoria la recuperación en el rendimiento funcional, la inflexibilidad y el malestar en personas con alguna anomalía en las articulaciones, disminución de arrugas. Además, aporta positivamente a la hidratación, elasticidad y firmeza de la piel (Gamazo Herrero, 2022).

La membrana testáctica del huevo es abundante en AH y Colágeno, haciendo de esta un posible recurso para la extracción de dichas sustancias. La extracción de estos compuestos es técnicamente viable gracias a los métodos elaborados para su separación y clarificación, como la extracción química y enzimática. Además, las cáscaras de huevo son un residuo agroindustrial presente en gran cantidad en Aguachica – Cesar, lo cual efectúa que sea una alternativa asequible para dicha extracción. El uso de las cáscaras de huevo como recursos para extracción disminuye en gran manera el efecto ambiental relacionado con la emisión de residuos agroindustriales (Bedoya-Salazar & Valencia-González, 2020).

1.2.4 Medios de separación de la membrana testácea y las cáscaras

Existen varios métodos para la separación de la membrana testácea y la cáscara de huevo, los cuales se mencionan a continuación:

La separación física por diferencia de densidades consiste en almacenar las cáscaras de huevo en un tanque con agua. A medida que se va adicionando las cáscaras, unas hélices generan una turbulencia que provoca la separación de las membranas debido menor densidad. Las membranas, al ser más ligeras, permanecen en la superficie del líquido, mientras que las cáscaras, por ser más pesadas, se depositan en el fondo del tanque (Chávez Feijoó, 2021).

Por otro lado, en la solución de EDTA, las cáscaras de huevo se colocan en un equipo de separación que cuenta con un contenedor de agitación y un contenedor de separación concéntrico. Las cáscaras se mezclan con una solución de EDTA 0,5 M, que se agita a una velocidad de 50 rpm. Durante este proceso, las cáscaras de huevo se precipitan, mientras que las membranas

flotan y se recogen en un tamiz (Chávez Feijoó, 2021).

Otra técnica es la separación química por disolución de la fase mineralizada usando HCL, ácido acético o EDTA. El carbonato de calcio (CaCO_3) es el principal componente de la cáscara de huevo. Bajo condiciones ácidas, su disolución rompe la barrera fuertemente unida, liberando la membrana de la cáscara (Chávez Feijoó, 2021).

1.2.5 Métodos de extracción del Ácido Hialurónico (AH) y Colágeno

En un estudio realizado sobre la optimización del método de extracción de AH del humor vítreo de *Oreochromis niloticus*, se utilizaron métodos como la extracción química y enzimática. En la extracción química, se tomaron 20 g de humor vítreo y se le agregaron 80 ml de NaCl al 0,2% (solución de cloruro de sodio concentrada al 2% de sal). Posteriormente, pasa por un tiempo de reposo y centrifugación, luego se procesó con cloruro de cetiltrimetilamonio (CTAB). Además, se usaron una variedad de solventes como cloruro de calcio, etanol y dimetilcetona, con múltiples centrifugaciones y reposos para hacer precipitar y extraer el AH (Pérez-Gumeta, 2018).

Por otro lado, en la extracción enzimática, se desgrasaron 28 g de humor vítreo con dimetilcetona, tras el secado, se disolvió en una solución en acetato sódico con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y cisteína. Luego se agregó papaína (o proteasa de papa) para descomponer las proteínas, manteniendo la mezcla en agitación. Por último, se obtuvo el AH a través de centrifugación y secado. Un estudio de varianza simple confirmó que mediante el método de extracción enzimático se obtuvo mayor eficacia de Ácido Hialurónico (Pérez-Gumeta, 2018).

En comparación con estos métodos, otro estudio sobre la Estandarización de un proceso de extracción de colágeno a partir de los residuos de fileteo de tilapia (*Oreochromis sp*) y cachama (*Piaractus brachypomus*) se hizo uso de un diseño factorial para estudiar las diversas combinaciones de los diferentes factores que influyen en la interacción del colágeno.

Principalmente, se realizaron procesos como la disminución de las pieles, en trozos de 1*1 cm aproximadamente, se hizo la decoloración con hipoclorito de sodio al 0,525% (p/v) en un tiempo de 10 min con una temperatura de 35°C, en una relación de 1:10 (peso de la piel a volumen de disolución). seguidamente, se lavaron las pieles con agua a °T ambiente en un tiempo de 10 min, con la misma relación 1:10 (Carolina & Gaona, 2011).

Luego, se realizó el proceso de hidrólisis enzimática aplicando la enzima TanG Plus al 3% (peso de la enzima a peso de proteína), con un pH de 8.6 en un periodo de tiempo de 180 min a 35°C, con la relación mencionada. En este proceso se degradan las proteínas y ayudan a la disolución del colágeno, seguidamente el lavado con agua (Carolina & Gaona, 2011).

A continuación, se realizó una solubilización ácida con ácido acético concentrado a 0.5 M en un periodo de tiempo de 300 min con 35°C, con la misma relación utilizada en el proceso anterior, en esta parte del proceso se solubiliza el colágeno. Seguidamente, se llevó a cabo la filtración a través de un filtro de acero inoxidable con malla N.20 (Carolina & Gaona, 2011).

El siguiente proceso realizado fue la precipitación salina con cloruro de sodio al 12% (p/v) en un lapso de 15 min a °T ambiente, las agitaciones fueron suaves con el fin de separar el colágeno. Luego, se lleva a cabo una resolubilización del colágeno usando ácido acético al 0.5 M en un tiempo de 15 min a 35 °C. Por último, se realizó la diafiltración con 5 diavolumenes, con un área de filtrado de 50 cm² y presión 25 psi en un periodo de 82 min °T ambiente. Este procedimiento estandarizado facilita la obtención de colágeno ácido soluble a base de la piel de las tilapias y las cachamas, con rendimiento de 33,3% en base seca (Carolina & Gaona, 2011).

En un artículo de revisión de los métodos de obtención de colágeno a partir de subproductos de especies marinas, se tuvieron en cuenta diversos métodos de extracción. Entre ellos, se destacan extracciones realizadas con pepsina, en este método se facilita la separación de las áreas telopéptidas de la triple hélice de colágeno, lo que favorece la extracción de péptidos en

solución. Se ha demostrado que este método incrementa la eficiencia de la extracción. (Cobeñas-Dueñas, 2022).

Asimismo, se llevó a cabo el método de extracción profunda con solvente eutéctico (DES), en este proceso se usa una mezcla de cloruro de colina y ácido oxálico. demostrando ser muy eficaz, ya que este método alcanzó rendimientos en la extracción alrededor del 90% para las pieles de bacalao. Esta eficiencia es mucho mayor que el de AcOH (27,2%) en piel de tilapia. Indicando que este método puede ser una opción sostenible y eficaz para la purificación de péptidos de colágeno de subproductos marinos (Cobeñas-Dueñas, 2022).

Además, se implementó el método de hidrólisis ácida con HCl y ácido acético (AcOH) para romper la triple hélice del colágeno, favoreciendo la eficiencia de la extracción. También se realizó la extracción de fluido supercrítico (SFE). Este método de extracción se considera como un procedimiento de extracción verde, mostrando una mayor selectividad y eficacia (Cobeñas-Dueñas, 2022).

Por otra parte, la extrusión – hidroextracción ha surgido como un método beneficioso, pues su producción es continua, tiene mayor rendimiento y es amigable con el ambiente; sin embargo, se requieren pasos de filtración y el equipo es costoso (Batista et al., 2022)

En contraste, una investigación sobre la optimización de la Extracción del Colágeno Soluble en Ácido de Subproductos de Tilapia Roja (*Oreochromis spp*) mediante un Diseño de Superficie de Respuesta, evaluó la extracción de colágeno de las escamas, la piel y las espinas. Esto se realizó a través de la extracción básica (NaOH) y extracción ácida (ácido acético) (Quintero & Zapata, 2017).

En la extracción básica, se limpiaron y secaron previamente las muestras. Luego, se adiciona una disolución de hidróxido de sodio en concentraciones variadas y óptimas temperaturas para la extracción. Posteriormente, se analizó la cantidad de proteínas de tejido

conectivo descompuestas, así como la proteína total y la cantidad de colágeno en la muestra (Quintero & Zapata, 2017)

De manera similar, en la extracción ácida se realiza el mismo proceso que en la extracción básica, pero se agrega ácido acético. A través del diseño factorial, se analizaron los impactos de las concentraciones de NaOH y ácido acético, con la variación de temperaturas en el proceso de extracción. Además, se llevó a cabo una evaluación del producto obtenido para calcular la cantidad de proteína hidrolizada, el pH y la humedad, siguiendo la NTC 3750 (Quintero & Zapata, 2017).

1.3 ESTADO DEL ARTE

La búsqueda de fuentes naturales para la extracción de compuestos bioactivos ha cobrado mayor relevancia en los últimos años, impulsada por el creciente interés en la sostenibilidad y el aprovechamiento de recursos subutilizados. El ácido hialurónico (AH) y el colágeno, dos biomoléculas de gran importancia en las industrias cosmética, farmacéutica y alimentaria, han sido tradicionalmente extraídos de fuentes animales y sintéticas. Sin embargo, la necesidad de alternativas más sostenibles ha incentivado la exploración de métodos de extracción a partir de desechos orgánicos.

Esta investigación se centra en la **viabilidad técnica de la extracción de ácido hialurónico y colágeno a partir de la membrana testácea y las cáscaras de huevo** en el municipio de Aguachica, Cesar. Estas materias primas, comúnmente desechadas, presentan un alto potencial para la obtención de compuestos bioactivos, contribuyendo así a la reducción de residuos y al desarrollo de una economía circular en la región. A través de una revisión detallada de la literatura y de los métodos de extracción existentes, se busca establecer un fundamento técnico que fortalezca la investigación en bioprocesos y sostenibilidad.

Además, se proyecta que **la demanda mundial de proteínas funcionales alcanzará los 7.980 millones de dólares en 2026**, con una tasa de crecimiento anual del 6,93% entre 2019 y 2026 (Caruso, 2016), lo cual respalda la necesidad de explorar nuevas fuentes funcionales como la membrana testácea

1.3.1 Composición del huevo

Comprender la estructura y composición del huevo es fundamental para su aprovechamiento como materia prima en procesos de extracción de compuestos bioactivos, ya que estas características influyen directamente en la eficiencia y calidad del producto obtenido. El huevo es una estructura biológica compleja diseñada naturalmente para proteger y nutrir al embrión. Para ello, cuenta con múltiples barreras físicas y químicas que impiden la contaminación microbiana externa y garantizan la estabilidad interna (Catalá, G.P., 2023).

Entre las barreras físicas destacan la cáscara, la membrana testácea, la cutícula, la clara (albumen) y la membrana vitelina que recubre la yema. Las barreras químicas incluyen proteínas con funciones antimicrobianas, como la lisozima y la fosvitina, un pH alcalino (alrededor de 9,5), moléculas secuestradoras de cationes, vitaminas, y enzimas inhibidoras como la antitripsina (Catalá, G.P., 2023).

En cuanto a su composición cuantitativa, la clara representa aproximadamente el 60% del peso total del huevo y se caracteriza por su elevado contenido proteico. La yema comprende entre el 30% y el 33%, aportando lípidos, proteínas y micronutrientes. La cáscara, que constituye alrededor del 9%, está compuesta principalmente por carbonato cálcico (94%), seguido de carbonato magnésico (1%), fosfato cálcico (1%) y un 4% de materia orgánica rica en proteínas. En la cara interna de la cáscara se encuentra la membrana testácea, que representa cerca del 3% del peso total del huevo y contiene colágeno y otros compuestos estructurales de interés (Catalá,

G.P., 2023).

Adicionalmente, La cutícula, rica en queratina, recubre la cáscara del huevo y protege sus poros, evitando la contaminación microbiana y permitiendo a la vez el intercambio de gases como oxígeno y dióxido de carbono, que se forma por contracción del albumen tras la puesta, aumenta con el tiempo y puede incidir en la calidad del material al momento de su procesamiento. Esta detallada composición fisicoquímica resulta clave para diseñar estrategias de extracción que permitan aislar eficientemente compuestos como el colágeno y el ácido hialurónico, especialmente a partir de la membrana testácea y la cáscara (Catalá, G.P., 2023)

Es de gran importancia distinguir la estructura y composición del huevo, para entender cómo se debe de tratar. De esta manera se puede asegurar la calidad y seguridad del mismo. El huevo es naturalmente creado como una estructura esencial para la protección y alimentación del embrión. Las barreras físicas y químicas protegen el embrión de la contaminación exterior y de la presencia de microorganismo bacterianos (Catalá, G.P., 2023).

La cáscara, la membrana testácea, la cutícula, la densidad, la estructura de la clara y la membrana exterior de la yema (membrana vitelina) son reconocidas como barreras físicas. Dentro de las químicas encontramos los compuestos del albumen (lisozima, fosvitina), su pH (alcalino, 9,5), las moléculas que secuestran cationes, proteínas y vitaminas, así como la (antitripsina) que sirve como inhibidor enzimático (Catalá, G.P., 2023).

Cáscara: Supone un 9% del peso del huevo y se compone de carbonato cálcico (94%), carbonato magnésico (1%), fosfato cálcico (1%) y materia orgánica (4% de proteína).

Membrana testácea: Está en la cara interna de la cáscara, y son un 3% aproximadamente del peso del huevo.

El huevo, como materia prima, está compuesto por diversas partes con características y proporciones específicas que afectan la extracción de compuestos bioactivos. La yema representa

entre el 30 y 33% del peso total, mientras que la clara o albúmina comprende aproximadamente el 60%, siendo esta última rica en proteínas. La cáscara, cubierta por una cutícula proteica de queratina, protege el interior del huevo y permite el intercambio gaseoso. Además, la cámara de aire, cuya dimensión aumenta con la edad del huevo, influye en la calidad del material de partida para procesos de extracción (Catalá, G.P., 2023) Esta composición estructural es clave para diseñar procesos eficientes que permitan separar y recuperar ácido hialurónico y colágeno de la membrana testácea y la cáscara (Catalá, G.P., 2023).

Marta Miguel Castro, en su artículo sobre la membrana de la cáscara de huevo como nuevo ingrediente funcional, señala que dicha cáscara está compuesta principalmente por materia inorgánica, siendo el carbonato de calcio su componente más abundante, el cual proporciona resistencia física y actúa como barrera frente al ingreso de patógenos. Asimismo, la **membrana testácea**, ubicada en la parte interna de la cáscara, se caracteriza por su alto contenido proteico (lisozima, ovotransferrina, ovocledidina, clusterina, ovoqueratina, ovodefensina) y por la presencia de **colágeno**, **ácido hialurónico** y otros **glucosaminoglicanos** (Fernandez, 2021).

Comúnmente la membrana es tirada junto con la cáscara, aunque, últimamente se han llevado a cabo métodos de extracción que han permitido el progreso de diversos usos, gracias a su composición química, mecánica y su bajo costo. En la industria alimentaria, la membrana se usa en la preparación de algunas salsas. Además, se usa como absorbente de dióxido de carbono y metales pesados. Por otro lado, en la biomédica, las membranas son usadas como película biocompatible y biodegradable en la curación de heridas y quemaduras por su alto contenido en colágeno (Fernandez, 2021).

1.3.2 Antecedentes

La extracción de ácido hialurónico y colágeno ha sido motivo de diversos estudios en los últimos tiempos, gracias a su importancia en las diferentes aplicaciones industriales.

Investigaciones como la de Estela Sánchez González en 2020 han demostrado la significancia del ácido hialurónico y colágeno en la elaboración de biopolímeros en la biomédica, se guiaron en el uso de colágeno y ácido hialurónico en un modelo 3D en ensayos de hepatotoxicidad (Sánchez, 2020).

En adición, Vélez y Fernandez afirmaron que la extracción de colágeno a base de subproductos avícolas surge como una manera sostenible e innovadora, dando valor a los residuos agroindustriales y disminuyendo su impacto en el ambiente. Esta perspectiva ha evidenciado aplicaciones positivas en áreas como la alimentación, la medicina, la cosmetología, resaltando importantes avances en las técnicas de extracción que están dirigidas a métodos más eficientes y ecológicos (Velez Miñano & Fernandez Baca, 2024).

Por otro lado, la investigación realizada por Alonso Machado Buezo en 2024 demostró la efectividad del AH en la cicatrización de los tejidos después de la extracción dental, esto se determinó gracias a la comparación entre pacientes tratados con AH y pacientes sin tratar con AH, indicando lo favorable que puede ser la utilización del AH en la regeneración de tejidos, ya que el AH disminuye la hinchazón y el dolor (Machado, 2024). Esta investigación insinúa la búsqueda de otras fuentes alternas para la extracción de AH, como las membranas testáceas y las cáscaras de huevo, siendo potencialmente viables.

De acuerdo con lo mencionado, en la tesis presentada en 2021, por Carina Berenice Fernández Cabañas, se afirma que: en 1979, la primera patente de hialuronano ultrapuro (HUA) es entregada a André Balzs, quien llevó a cabo una investigación estructurada en cinco etapas, en las cuales hizo uso de la cresta de gallo y cordón umbilical humano para extraer ácido hialurónico. Con esta investigación, Balzs confirmó la posibilidad de extraer AH de las crestas y del cordón umbilical, aportando significativamente a la extracción de AH con mayor pureza para sus potenciales usos en la biomédica, por ejemplo: en la cirugía ocular, como sustituyente del

cuerpo vítreo. Además, en su trabajo se realizaron procedimientos de optimización de la extracción y purificación, lo cual concede la disminución de la degradación del AH y excluir las proteínas no deseadas (Fernandez, 2021).

En un estudio de factibilidad para la elaboración de una crema hidratante antienvjecimiento con aceite de aguacate (*Persea americana*) enriquecida con ácido hialurónico en el cantón Ambato, provincia de Tungurahua, realizado por Andrea Alexandra Coca Gaibor y Alejandra Monserrath Rivera Reinoso en 2023, demuestra que la gran mayoría de las personas encuestadas (97,4%) podrían usar la crema antienvjecimiento nutrida con AH y aceite de aguacate. El AH se distingue por su habilidad de almacenar agua, aportando significativamente a la hidratación de la piel. Por lo cual, se estima que la crema ayude a disminuir los signos de la edad. Sugiriendo una gran demanda para productos que incluyen ingredientes como este(Coca, 2023).

1.3.3 Métodos de extracción

En la tesis de Carina Berenice Fernández Cabañas, también se afirma que el trabajo de Andre Balzs, fue crucial para determinar métodos eficaces en la extracción y purificación de AH, resaltando su viabilidad en aplicaciones médicas. En esta investigación se guiaron de una secuencia de pasos para extraer el AH de la cresta de gallo a través de la **hidrólisis enzimática** (Fernandez, 2021).

Inicialmente, las crestas se lavan con agua, dimetilcetona, etanol (95%) o también se puede usar una combinación de etanol y cloroformo para quitar los contaminantes y evitar la descomposición enzimática del AH. Seguidamente, las crestas deben permanecer en agua helada, la cual debe ser cambiada periódicamente. Después, se escurren y se adiciona agua en una proporción de 1:2.5 (cresta/agua) y se pone a hervir. Este procedimiento se realiza 6 veces, la extracción quinta y sexta son los usados para la purificación. Por consiguiente, se mezclan los

extractos y se deposita el polisacárido con ácido acético a PH=5 en un lapso de tiempo de 18,5h. Luego, el sedimento se separa y es disuelto en agua destilada, regulando el pH=8 con hidróxido de sodio. Para realizar la hidrólisis enzimática de proteínas se utiliza papaína en un tiempo de 20 a 40h, regulando pH cada 6 a 8 h (Fernandez, 2021).

El AH es purificado a través de la ultrafiltración y precipitación con etanol (96%). El resultado es secado mediante liofilización y purificado a través de la filtración con una mezcla de 30-50% de etanol. Con este método se puede obtener un buen rendimiento en la extracción, ya que, se permite extraer hasta 7.5 mg de AH por 1 gr de cresta de gallo (Fernandez, 2021).

Esta investigación confirma que la extracción y purificación de AH extraído de las crestas es eficaz y con posibles optimizaciones para aumentar el rendimiento del biopolímero. La mezcla de métodos, tanto físicos como enzimáticos, posibilitan la obtención de productos de buena calidad, los cuales pueden ser usados en diversas áreas, dentro de estas la medicina y la odontología(Fernandez, 2021).

Por otra parte, José Humberto Pérez Alfaro en su proyecto de extracción química de AH a partir del humor vítreo de residuos acuícolas, siguió la metodología de extracción química empleada por Guillermo Lago en 2007. Aunque, se realizaron algunos cambios gracias a la materia prima utilizada en ese caso. Los ojos de los pescados fueron recolectados y previamente pesados. Seguidamente, fueron diseccionados, con el fin de obtener el humor vítreo. Después, se tomó el peso final del humor vítreo extraído(Pérez, 2016).

En este proyecto, se llevaron a cabo cuatro lotes, con dos tratamientos cada uno, en variadas condiciones:

Lote 1. Se realizaron dos tratamientos para la extracción de AH. Cada tratamiento se realizó con 20 g de humor vítreo, y se le adicionaron 80 ml de Cloruro de Sodio (NaCl) al 0,2% y se reposó en un tiempo de 15 minutos. Luego, pasó por un proceso de centrifugación a 4000 rpm,

durante 20 min a temperatura de 25°C. Al sobrenadante, se le adicionaron 6 ml y 12 ml de CTAB al 1% y se dejó en reposo durante 15 minutos. Seguidamente, se centrifuga durante 20 minutos a 4000 rpm a temperatura de 25°C (Pérez, 2016).

Tratamiento 1: al sedimento (2.8 g) se le adicionaron 2.1 ml de cloruro de calcio (CaCl) 75% a 0.9 M y 1.225 de etanol acuoso 25%. Luego, se centrifugó durante 20 min a las mismas revoluciones ya mencionadas. El sobrenadante se lavó con 0.6125 ml de cloroformo durante 4 veces en un embudo de separación y a lo obtenido se le adiciono etanol y acetona 5.053 ml 75%(Pérez, 2016).

Tratamiento 2: al sedimento (3.1 g) se le sumaron 2.325 ml de CaCL 75% a 0.9 M y 1.356 de etanol acuoso 25%. Seguidamente, paso por centrifuga a las mismas condiciones del tratamiento 1. El sobrenadante es tratado de igual forma que en el tratamiento 1 pero con 0.6781 ml de cloroformo. A lo derivado se adiciono 5.594 ml de etanol y acetona 75%(Pérez, 2016).

Las soluciones reposaron durante 12 h, para luego, pasar por centrifugación a las mismas condiciones anteriores. Se obtuvo el precipitado de cada tratamiento y se puso a secar durante una semana en una campana de extracción a temperaturas ambientales(Pérez, 2016).

Lote 2. Cada tratamiento se hizo con 23.88 g de humor vítreo y se le adicionaron 95.5 ml de Cloruro de Sodio (NaCl) al 0,2%, se reposo 15 min. Luego, se centrifugó a 25 °C, durante 20 min a 4000 rpm. Al sobrenadante se le adiciono 7.164 ml y 14.328 ml de CTAB al 1% y se dejó reposar 15 min y se centrifuga 20 min a 4000 rpm a 25°C (Pérez, 2016).

Tratamiento 1: al sedimento (2.9 g) se le aportaron 2.175 ml de Cloruro de Calcio (CaCl) 75% a 0.9 M y 0.725 de etanol acuoso 25%. Luego, pasó por centrifugación 20 min a 4000 rpm. El sobrenadante fue lavado con 0.58 ml de cloroformo 4 veces en un embudo de separación. A lo obtenido se le adiciono 5.594 ml de etanol y acetona 75% (Pérez, 2016).

Tratamiento 2: Al sedimento (3.4 g) se le incorporaron 2.55 ml de Cloruro de Calcio 75%

al 0.9 M y 1.488 ml de etanol acuoso 25%. Seguidamente, se centrifugó 20 min a las mismas revoluciones del tratamiento anterior. El sobrenadante fue lavado 4 veces con 0.744 ml de cloroformo en un embudo de separación. A lo obtenido se le adiciono 5.579 ml de etanol y acetona 75% (Pérez, 2016).

Lote 3. Para los tratamientos fueron usados 29 g de humor vítreo, a los cuales se le adicionaron 116 ml de cloruro de sodio al 0.2 % y se reposo 15 min. Luego, pasó por centrifugación 20 min a 4000 rpm y a 25°C. Al sobrenadante se le adiciono 8.7ml y 17.4 ml de CTAB al 1%, se reposo 15 min, luego fue centrifugado a las mismas condiciones anteriores (Pérez, 2016).

Tratamiento 1: Al sedimento (2.8 g) se le integraron 2.1 ml de cloruro de calcio 75% a 0.9M y 1.225 de etanol acuoso 25%, luego fue centrifugado a las condiciones ya mencionadas. Al sobrenadante fue lavado cuatro veces con 0.6125 ml de cloroformo. A lo obtenido se le añadió 5.053 ml de etanol y acetona 75% (Pérez, 2016).

Tratamiento 2: Al sedimento (3.1 g) se le integraron 2.325 ml de cloruro de calcio 75% a 0.9M y 1.356 de etanol acuoso 25%, luego fue centrifugado a las condiciones ya establecidas. El sobrenadante fue lavado cuatro veces con 0.6781 ml de cloroformo. A lo obtenido se le incorporó 5.594 ml de etanol y acetona 75% (Pérez, 2016).

Las soluciones fueron reposadas 12h, seguidamente se centrifugó y se recuperó el sedimento de ambos tratamientos, se secó en un lapso de una semana en una campana de extracción a temperaturas ambientales (Pérez, 2016).

Lote 4. Para estos tratamientos se usaron 65 g de HV para cada uno. Se le añadieron 116 ml de cloruro de sodio al 0.2%. Luego, se reposo 15 min y se centrifugó. Al sobrenadante se le aportaron 8.7 ml y 17.4 ml de CTAB al 1% y se reposa 15 min, seguidamente es llevado a centrifugación (Pérez, 2016).

Tratamiento 1: Al sedimento (3.9 g) se le sumaron 2.93 ml de cloruro de calcio 75% al 0.9M y 0.98 de etanol acuoso 25%. Después, fue centrifugado y el sobrenadante fue lavado cuatro veces con 0.7805 ml de cloroformo, a lo obtenido se le adiciono 6.442 ml de etanol y acetona 75% (Pérez, 2016).

Tratamiento 2: Al sedimento (4.3 g) se le incorpora 3.225 ml de cloruro de calcio 75% a 0.9M y 1.075 de etanol acuoso 25%. Luego, fue centrifugado y el sobrenadante fue lavado 4 veces con 0.86ml de cloroformo. a lo obtenido se le incorporó 7.096 ml de etanol y acetona 75% (Pérez, 2016).

Las soluciones fueron reposadas 12 horas, y seguidamente centrifugadas. Se extrae el sedimento de cada tratamiento y se seca una semana a temperatura ambiente (Pérez, 2016).

Con base en los resultados, se afirmó que la extracción fue exitosa, gracias a que las diversas pruebas probaron la presencia del polisacárido. Con la extracción química se demostró rendimiento de 0.00083g de AH crudo por cada gramo de humor vítreo (0.0830 % p/p). Sin embargo, el rendimiento puede cambiar por las características de la materia prima. Además, la cuantificación de AH por espectroscopia de UV-Vis se afirma rendimiento de 0.000022g de AH puro por gramos de HV (0.0022%). Con la electroforesis en gel de agarosa se establece el peso molecular del AH obtenido (8 y 15 kDa), este resultado se le asigna al método de extracción, gracias a que se han mostrado casos de extracción con peso molecular de 100 kDa en ojos de tilapia(Pérez, 2016).

En una revisión sobre el colágeno marino: fuentes, métodos de extracción, propiedades coloides y aplicaciones alimentarias, publicado el 18 de marzo de 2024, utilizaron como fuentes de colágeno la piel de diversos animales marinos y se mencionan diversos métodos de extracción de colágeno, descritos a continuación:

Extracción ácida: se inició con la preparación de la materia prima, lo que incluye limpiar

y descalcificar, dejando únicamente las moléculas de colágeno. Seguidamente, la materia prima es adicionada en ácido acético (0,5 M), siendo una solución extracto, ya que obtuvo mayor rendimiento (90%) en comparación con ácido clorhídrico (18%), en un lapso de 2 a 4 días, lo cual facilitó la solubilización del colágeno. El ácido acético disuelve los enlaces inter e intramoleculares no covalentes dentro del colágeno. Utilizar este método es ventajoso debido a que es un proceso sencillo, que no daña la estructura del colágeno y es rentable. Aunque el periodo de extracción es largo y se puede presentar coloración oscura de las proteínas (Batista et al., 2022).

Extracción Enzimática: el proceso inicial es la preparación de la materia prima, seguidamente, se lleva a cabo la preparación de la solución, se puede emplear solamente pepsina o mezclada con diversas concentraciones de ácido acético. Dentro las condiciones óptimas para la extracción se consideran temperaturas de 4-10 °C en el transcurso de la extracción, esto se hace con el fin de evitar la autodigestión y desactivación de la pepsina. La incubación con pepsina se realiza en un lapso favorable que aumente el rendimiento del colágeno. Finalmente, se pudo notar que al pasar de nivel de pepsina de 800 a 1200 U/g, el rendimiento aumenta de 66,35% a 79,93%. Con la extracción enzimática, se obtiene un mayor rendimiento, no es inflamable, ni tóxico, pero es difícil de ampliar y la enzima es costosa (Batista et al., 2022).

Extracción profunda con disolventes eutécticos: estos disolventes son mezclas de dos o más compuestos que muestran una depresión significativa del punto de fusión en una composición específica, se convierten en líquidos a temperaturas ambientales. Estos disolventes se forman a través de la asociación entre un aceptor y un donante de enlaces de hidrógeno. Además, el uso de estos disolventes formados por componentes naturales hace que el método sea óptimo para la extracción de proteínas de colágeno y otros compuestos. Por otra parte, este método ofrece rentabilidad, diversas combinaciones y poca toxicidad. Sin embargo, se puede

prolongar el tiempo de extracción y existe la posibilidad de degradación de la proteína (Batista et al., 2022).

Batista, Fernández, en su investigación en 2022, sobre la extracción de colágeno biocompatible de pieles de tiburón azul mediante la intensificación del proceso de extracción convencional utilizando solventes eutécticos profundos naturales, implementó una metodología sostenible para la extracción del colágeno a través de estos solventes, en la cual utilizó: xilitol, ácido cítrico, agua, en una proporción de molar de 1:1:10. dando como resultado el aislamiento de más del 21% del contenido de proteína de la piel de tiburón, sobrepasando métodos convencionales en 2,5 veces, sin requerir un tratamiento previo de la materia prima. Además, se redujo el tiempo del proceso de 96 h a 1h, en comparación con los solventes estudiados por Bai, Wei en 2017 (Farooq et al., 2024).

Extracción con fluidos supercríticos: La extracción con este método es ventajosa por su rendimiento, selectividad y reducción del impacto ambiental. Sin embargo, presenta alto costo de mantenimiento y posibles cambios estructurales. El dióxido de carbono es comúnmente usado para la extracción de compuestos bioactivos a través de este método. Además, el soporte a la presión y temperaturas críticas hace que estos fluidos presenten compresión parecida a los gases y su menor densidad y capacidad de disolución son parecidas a la de los líquidos (Batista et al., 2022).

Además, su capacidad de difusión permite la inmersión en materiales sólidos, facilitando la dilución y la facilidad de acceso (Sousa et al., 2020).

Extrusión - hidroextracción: En el estudio realizado por Huang, Kuo, sobre el aislamiento y caracterización del colágeno de escamas de pescado de tilapia (*Oreochromis sp.*) mediante un nuevo proceso de extrusión-hidroextracción, se pudo apreciar, que el uso de altas presiones en el proceso de extrusión favorece el rendimiento de la extracción (7,5 y 12,3%),

siendo este mucho mayor a las escamas no extruidas. Este método usa la extrusión para romper los enlaces del colágeno y la hidroxiapatita (Huang et al., 2016).

Extracción asistida físicamente: este tipo de métodos aporta a la mejora de la solubilización y la homogeneidad del tejido, contribuyendo significativamente a la eficiencia y rendimiento de la extracción en un tiempo determinado, en comparación con los métodos ácidos y enzimáticos tradicionales (Sousa et al., 2020). Se propuso una técnica para separar el colágeno marino, mezclando el tratamiento ácido con una diversos procesos físicos y mecánicos, los cuales involucran el ajuste del pH, la sonicación, la mezcla y la homogeneización (Nuerjiang et al., 2023). En la investigación sobre la mejora de la extracción de colágeno de medusas (*Acromitus hardenbergi*) mediante procesos de solubilización inducidos físicamente las extracciones asistidas físicamente mostraron mayor aumento en la eficiencia, con una mejoría de 5 a 7 respecto a la materia prima utilizada en comparación con la extracción asistida por ácido. Por otro lado, se duplicó el incremento en comparación con la extracción asistida con pepsina (Khong et al., 2018).

Extracción por solubilización de sal: la extracción de colágeno a través de este método no es tan eficiente por la poca solubilidad del colágeno (Farooq et al., 2024).

Aunque, se pudo extraer colágeno del cartílago del esturión de Amur (*Acipenser schrenckii*) con cloruro de sodio, agitación continua, durante 24 horas. El colágeno obtenido a través de solubilización en sal fue comparado con el extraído por otros medios y las diferencias son significativas en cuanto a su estabilidad térmica, estructura y rendimiento. El colágeno extraído con pepsina tuvo un rendimiento del 55,92%, el extraído en ácido 27,04% y el extraído en sal 2,18 (Liang et al., 2014).

2. DISEÑO METODOLÓGICO

Tipo de investigación: Investigación exploratoria, aplicada de tipo experimental comparativo.

Es una investigación exploratoria, por la reducida información sobre el tema en cuestión.

Por otra parte, aunque no es un experimento a gran escala usa métodos experimentales para analizar sus resultados, siendo una investigación aplicada de carácter comparativo.

Población: La población son los 26 establecimientos de Reposterías y panaderías registrados en la cámara de comercio, en el municipio de Aguachica-Cesar. Se estudiaron reposterías y panaderías que son de tipo microempresa donde emplean técnicas artesanales o industriales.

Muestra: la muestra estará conformada por cuatro establecimientos, los cuales serán seleccionados de forma intencional o conveniente, gracias a condiciones específicas importantes para la investigación. Se seleccionarán muestras ejemplares de las membranas testáceas y las cáscaras de huevo. La cantidad de las muestras de las cáscaras de huevo recolectadas se medirán en porcentajes (%) por cada repostería y panadería. Y se reunirá una cantidad significativa de cáscaras de huevos semanalmente de cada punto seleccionado.

Procedimiento de recolección de la muestra: Se contactará a las cuatro reposterías y panaderías que fueron seleccionadas de forma conveniente, para solicitar la participación y la organización de la recolección de las muestras.

Por idea nuestra, el proceso de recolección de las muestras se hará en un periodo de tiempo de una semana. Además, las cantidades recolectadas en cada repostería y panadería serán rotuladas y almacenadas, con el fin de usarlas en la extracción en cuestión.

Instrumentos de recolección de datos: Para llevar a cabo el funcionamiento de este estudio, contamos con una variedad de estrategias o instrumentos de recopilación de datos el cual

nos permiten obtener o conseguir información precisa, clara y relevantes sobre el proceso de extracción de colágeno y ácido hialurónico.

2.2 Fuentes de información de las empresas

Cámara de comercio de Aguachica: Se gestionó información detallada de empresas de la industria pastelera y panificadora legalmente constituidas en la ciudad de Aguachica, Cesar, a partir de la cual se obtuvieron datos relevantes como ubicación, contactos y otros aspectos logísticos.

Entrevista con los empresarios. Se llevará a cabo un diálogo estructurado con los propietarios, gerentes o encargados de las panaderías y reposterías seleccionadas previamente mediante muestreo aleatorio, con el propósito de recopilar información complementaria sobre los procesos de producción, la cantidad de residuos generados y el manejo o disposición final de las cáscaras de huevo.

El formato de la entrevista se encuentra disponible en el **Anexo 1**, según el documento de **Formato 3 de monografías**.

2.3 Fuentes de información científica

Web of Science: se emplea esta base de datos el cual permite ampliar la búsqueda de artículos científicos que tengan correlación con la extracción del ácido hialurónico a partir de las cáscaras de huevos de gallina, utilizando formulación de palabras claves o frases destacadas.

Scopus: se realizará investigación integral de artículos científicos relevantes, incorporando revistas científicas, conferencias los cuales están relacionados al aprovechamiento de las cáscaras de huevo y su respectiva utilización.

Springer: se asesorará sobre publicaciones científicas de esta editorial, el cual permitirá obtener informaciones más recientes sobre las técnicas, tecnologías ascendientes y procesos de aplicaciones innovadoras de extracción de ácido hialurónico y colágeno.

Base de datos de la Universidad Popular del Cesar (UPC): se accede a la base de datos que nos proporciona la Universidad Popular del Cesar para la aplicación y la obtención de información científica relevante sobre métodos de extracción de ácido hialurónico, en la que se incluyan tesis, artículos y otros diferentes tipos de investigación o publicaciones.

Google Académico: se ejecuta una búsqueda exhaustiva en esta base de datos para lograr obtener información científica complementaria, en el cual se incluyan artículos, libros y otros tipos de disfunciones relevantes al tema.

2.4 Métodos y procedimientos

Caracterización preliminar de la producción de residuos: Para la realización de este objetivo se requiere averiguar en la cámara de comercio de Aguachica-cesar las empresas legalmente constituidas que generen residuos de huevos de gallina. Además, se debe conocer qué hacen las panaderías con estos residuos a través de encuestas realizadas a los empleados, administradores o dueños. Se tomarán datos de la magnitud de residuos generados por las panaderías de Aguachica durante una semana, las panaderías seleccionadas coleccionan estos sobrantes, se mostrarán los resultados a través de tablas u otros medios. Por último, se realizará la interpretación de los resultados promediando las cantidades de residuos generados por las diferentes panaderías seleccionadas aleatoriamente.

Análisis comparativos de métodos de extracción de colágeno y ácido hialurónico: Para llevar a cabo el desarrollo de este objetivo se requiere una revisión literaria con fuentes científicas, orientada en técnicas de extracción ya usadas en fuentes similares. Posteriormente, se identificarán y relacionarán los métodos más usados y eficaces. Seguidamente, se llevará a cabo un procedimiento experimental teórico, detallando el proceso de extracción. Por último, se realizará un análisis teórico sobre la eficacia de dichos métodos.

Evaluación de la efectividad técnica del método de extracción seleccionado: Para el

desarrollo de este objetivo se requiere la descripción detallada del método de extracción, basado en la literatura. Se identificarán factores de rendimiento, pureza y eficiencia. Además, se realizará una tabla comparativa con otros métodos de extracción presentes en la literatura. Por último, se analizará la viabilidad técnica del método en cuestión.

2.4.1 Justificación del método seleccionado para la evaluación técnica

La evaluación de la efectividad técnica del método seleccionado para la extracción de ácido hialurónico y colágeno se fundamenta directamente en los hallazgos obtenidos a través del análisis comparativo de métodos (objetivo específico 2). En esta etapa previa, se revisaron y contrastaron diversos procedimientos de extracción descritos en la literatura científica, incluyendo métodos químicos, enzimáticos, físicos y combinados, con énfasis en su aplicabilidad a matrices similares como la membrana testácea y la cáscara de huevo.

Dicha comparación permitió identificar el método que presenta mayores ventajas en términos de rendimiento, pureza del producto, menor tiempo de procesamiento, menor toxicidad de los reactivos, y factibilidad de implementación en las condiciones técnicas disponibles en el laboratorio de la Universidad Popular del Cesar. De esta forma, el método seleccionado no es resultado de una elección arbitraria, sino del análisis riguroso de su desempeño frente a otros procedimientos documentados.

A partir de esta selección fundamentada, el tercer objetivo busca evaluar su efectividad técnica mediante parámetros cuantificables como el porcentaje de recuperación, estabilidad del compuesto extraído, características organolépticas, y resultados obtenidos en pruebas microbiológicas y microscópicas. Esta evaluación permitirá determinar si el método es viable no solo desde el punto de vista teórico, sino también práctico y reproducible en contextos locales como el municipio de Aguachica, contribuyendo al aprovechamiento sustentable de residuos agroindustriales.

2.5 Instrumentos analíticos:

Para el desarrollo de esta monografía, se llevará a cabo una exhaustiva investigación de literaturas a través de diversas bases de datos científicas acreditadas. Las fuentes consultadas serán: Web of Science, Scopus, Springer, Base de datos de la Universidad Popular del Cesar (UPC) y Google Académico. Estas plataformas virtuales fueron elegidas por su extensa cobertura de publicaciones académicas y científicas, el cual permite acceso a investigaciones relevantes y actualizadas sobre el tema de interés.

La investigación se centra en el proceso de extracción de ácido hialurónico y colágeno, utilizando ecuaciones de búsqueda como: “Eggshell and, waste and, beauty and, health”, “Eggshell or, waste or, beauty or, health”, “Eggshell not, waste not, beauty not, health”, “extracción de ácido hialurónico” y “fuentes de colágeno” el cual se enfocó en estudios realizados en los últimos cinco años para asegurar la actualización de la información.

La información reunida se espera suministre un panorama integral sobre los métodos de extracción, los desafíos y las innovaciones recientes, el cual permite un análisis más detallado y actualizado en la monografía

2.6 Análisis y tabulación de datos

Se llevará a cabo un análisis y tabulación de datos, recopilando información mediante la elaboración de una matriz. Esta matriz, es desarrollada por los autores, donde se incluyen datos como los nombres de los autores, el año de publicación, las referencias y el aporte específico de cada fuente a nuestra monografía.

La matriz facilitará la identificación de patrones, tendencias y lagunas en la literatura existente, permitiendo una evaluación más precisa de la calidad e importancia de cada fuente. Este proceso ayudará a obtener una comprensión más amplia de la temática y a organizar la información de manera más efectiva, contribuyendo significativamente a la elaboración de la

monografía.

2.7 Hipótesis

Hipótesis alternativa positiva: La extracción química de Ácido Hialurónico y colágeno a base de las membranas testáceas en Aguachica es técnicamente viable y su rendimiento es comparable con investigaciones ya realizadas.

Hipótesis alternativa positiva: Las cantidades significativas de desechos producidas por las panaderías de Aguachica podrían ser aprovechadas para la extracción de ácido hialurónico y colágeno.

3. DESARROLLO DEL TEMA:

Caracterización preliminar de la producción de residuos: Con el objetivo de obtener información sobre las empresas legalmente constituidas que generan residuos de huevos de gallina, se llevó a cabo una visita a la Cámara de Comercio de Aguachica, Cesar. Durante esta gestión, se solicitó información relacionada con establecimientos dedicados a la repostería y panadería en el municipio. Posteriormente, a través de correo electrónico, se recibió la confirmación de la existencia de 26 empresas registradas que cumplen con estas características.

De acuerdo con la información recopilada, se seleccionaron cuatro establecimientos mediante un muestreo por conveniencia. Posteriormente, se visitó cada uno de ellos para solicitar su participación en el cumplimiento del objetivo del estudio, acordando realizar la recolección de datos durante una semana.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en cada establecimiento: en *Carmen Pastelería* se recolectaron 2.918 kg de materia prima, de *Tortas Kelly* 3.225 kg, de *Panadería Santa Clara* 2.650 kg y de *Tortas y Más* 2.256 kg. Además, los establecimientos accedieron a proporcionar información sobre el número de empleados, el tiempo de funcionamiento, la cantidad de huevos utilizados, la gestión de las cáscaras, la colaboración con programas de recolección, el manejo sostenible de los recursos y la participación en la red de recolección. En la tabla 1 se reporta la información recolectada en las encuestas.

TABULACIÓN DE RESULTADOS DE LAS ENCUESTAS									
N.º	NOMBRE DEL ESTABLECIMIENTO	MATERIA PRIMA RECOLECTADA	NUMERO DE EMPLEADOS	TIEMPO DE FUNCIONAMIENTO	HUEVOS UTILIZADOS	GESTION DE CÁSCARA	COLABORACION CON PROGRAMAS DE RECOLECCION	MANEJO SOSTENIBLE DE LOS RESIDUOS	PARTICIPACION EN RED DE RECOLECCION
1	Carmen Pastelería	2.918 kg	5-10	>5	100-200	desechan	Si	Si	si
2	Tortas Kelly	3.225 kg	>10	>5	>200	desechan	Si	Si	si
3	Panadería Santa Clara	2.650 kg	5-10	>5	100-200	desechan	Si	No	si
4	Tortas y mas	2.256 kg	5-10	>5	100-200	desechan	Si	No	si

Tabla 1 tabulación de respuestas

Los resultados presentados en la **tabla 1** caracterización de establecimientos evidencia una alta disponibilidad de cáscara de huevo en panaderías y pastelerías del municipio, así como disposición a colaborar con programas de recolección. Esto representa una oportunidad para desarrollar proyectos de extracción de colágeno y ácido hialurónico, con beneficios ambientales y económicos, promoviendo una economía circular en el sector agroindustrial local.

3.1 Análisis Gráfico de Resultados de la Encuesta Aplicada a Establecimientos Comerciales.

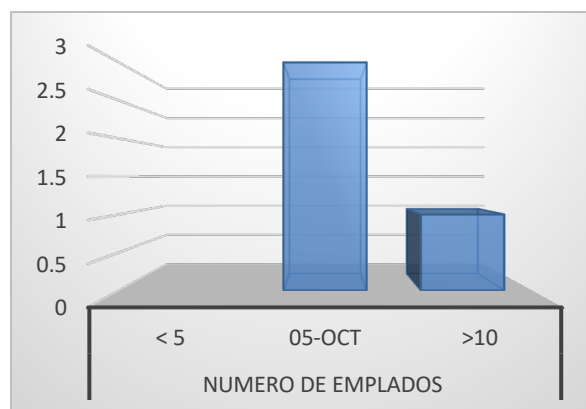
Con el objetivo de conocer las características operativas, hábitos de consumo y disposición ambiental de los establecimientos que generan residuos de cáscaras de huevo, se aplicó una encuesta a diferentes negocios del municipio. A partir de la información recolectada, se elaboraron una serie de gráficas que permiten visualizar los aspectos más relevantes de estos establecimientos.

3.1.1 Actividad económica y número de empleados

Antes de implementar cualquier estrategia de recolección o aprovechamiento de cáscaras de huevo, es fundamental conocer el tipo de actividad económica que desarrollan los establecimientos y su capacidad operativa, como se muestran en la **gráfica 1 y 2**



Gráfica 1 Actividad económica principal de los establecimientos encuestados



Gráfica 2 Número de empleados por establecimiento comercial encuestado

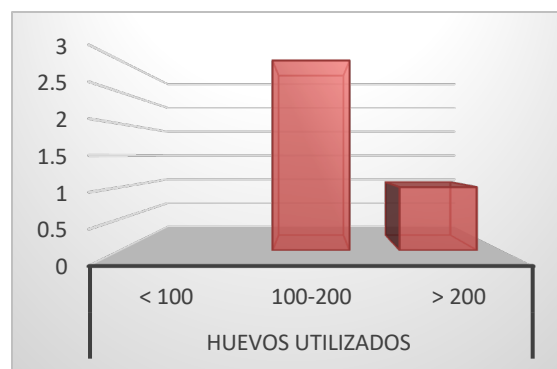
A continuación, se presenta la actividad económica principal de cada uno de los establecimientos evaluados. La **gráfica 1** permite identificar de forma clara y precisa la principal actividad económica de cada uno de los establecimientos incluidos en la encuesta. muestra que tres de los establecimientos encuestados corresponden a reposterías, mientras que uno es una panadería. Este dato es importante, ya que indica que el uso intensivo de huevo está ligado principalmente a la repostería, sector clave en la generación del residuo estudiado. Por su parte, la **gráfica 2** revela que dos locales cuentan con entre 5 y 10 trabajadores, mientras que uno tiene más de 10 empleados. Esta diferencia sugiere distintas escalas de producción, lo cual puede influir en la cantidad de cáscaras generadas y, por ende, en el volumen disponible para procesos de reutilización.

3.1.2 Antigüedad del negocio y consumo de huevo

El tiempo de funcionamiento de los establecimientos y su consumo de huevo por semana, se pueden visualizar en la **gráfica 3 y 4** permiten identificar tanto la estabilidad como el nivel de generación del residuo objetivo.



Gráfica 3 Antigüedad de los negocios

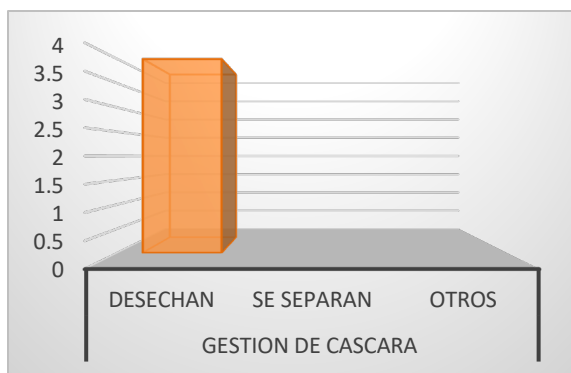


Gráfica 4 consumo semanal de huevos

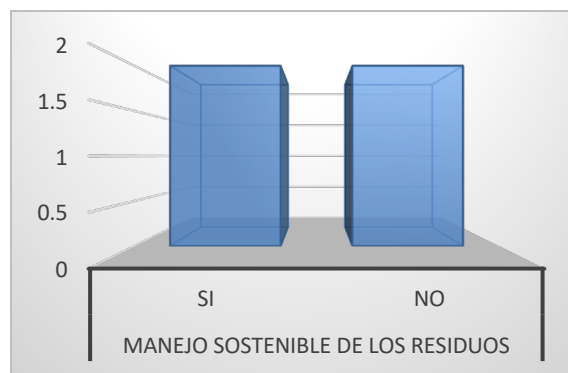
La **gráfica 3** muestra el tiempo de funcionamiento de las empresas participantes desde su fundación hasta la actualidad. De acuerdo con los datos, la mayoría de las empresas encuestadas presentan una trayectoria de más de 5 años en el mercado, lo que sugiere que son negocios consolidados y con operaciones regulares. Esto representa una ventaja al momento de establecer alianzas para la recolección de residuos. En la **gráfica 4**, se observa que tres empresas emplean entre 100 y 200 huevos por semana, mientras que una de ellas supera las 200 unidades. Estos niveles de consumo permiten estimar el volumen potencial de cáscaras generadas, lo que respalda la viabilidad técnica de proyectos de valorización de este subproducto.

3.1.3 Manejo de residuos y prácticas sostenibles actuales

Otro aspecto clave es el tratamiento que actualmente se les da a los residuos en estos establecimientos, así como la implementación de prácticas sostenibles, como se muestran a continuación en la **gráfica 5 y 6**



Gráfica 5: gestión de cáscaras



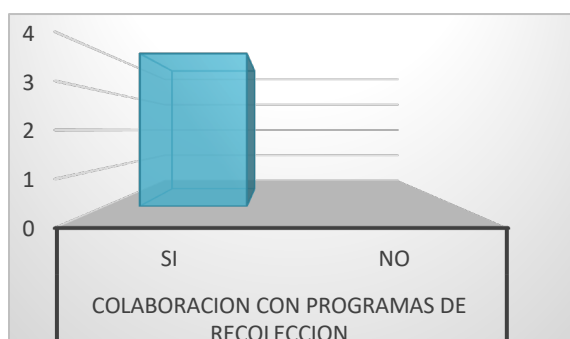
Gráfica 6: Manejo sostenible

La **gráfica 5**, evidencia que ninguno de los cuatro establecimientos encuestados realiza una gestión adecuada de los desechos de cáscaras de huevo. En todos los casos, los residuos generados son depositados en una misma bolsa junto con otros tipos de desechos, sin ningún tipo de separación o tratamiento. Esta práctica representa una oportunidad de mejora en términos de manejo ambiental y aprovechamiento de residuos orgánicos.

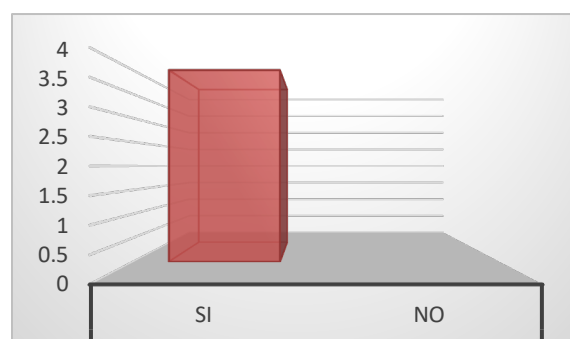
Por otro lado, la **gráfica 6** indica que dos negocios sí han implementado acciones sostenibles, aunque limitadas a la separación de residuos plásticos. No se reporta ninguna acción para los residuos orgánicos, lo que señala la necesidad de promover una gestión integral de todos los desechos. Esto significa un avance parcial en la adopción de prácticas sostenibles.

3.1.4 Disposición para participar en programas de recolección

Finalmente, se evaluó la actitud de los establecimientos frente a la posibilidad de colaborar con un programa de recolección de cáscaras de huevo y su interés en formar parte de una red organizada para tal fin.



Gráfica 7 Disposición a colaborar



Gráfica 8 participación en redes de recolección.

La **gráfica 7** muestra que todos los establecimientos están dispuestos a colaborar con una iniciativa de recolección de cascaras de huevos. Esta disposición representa una base sólida para el desarrollo de un modelo de recolección periódica. Complementariamente, La **gráfica 8** evidencia que los cuatro establecimientos encuestados estarían dispuestos a integrarse a una red organizada para tal propósito. Este interés demuestra un fuerte potencial de cooperación y compromiso con la sostenibilidad, elementos clave para la implementación exitosa del proyecto.

3.2 Análisis comparativos de métodos de extracción de colágeno y ácido hialurónico

Para desarrollar este objetivo, se utilizó un instrumento de recopilación de datos que permitió obtener información verificada sobre el proceso de extracción de ácido hialurónico y colágeno a partir de las cáscaras y membranas testáceas del huevo de gallina, tomando como referente técnicas de extracción ya empleadas en fuentes similares.

Se realizó una investigación minuciosa en bases de datos científicos confiables, utilizando palabras clave como: "*extraction and hyaluronic acid and collagen*", "*extraction and hyaluronic acid and collagen and testaceous membranes and egg shells*", "*chemical extraction and hyaluronic acid and collagen*", y "*extracción de ácido hialurónico y colágeno*".

Se encontraron aproximadamente 17.000 artículos relacionados con el tema en cuestión.

Para garantizar la calidad y pertinencia de la información, se aplicaron criterios de exclusión con los artículos que no tenían nada que ver con extracciones, o los que mencionaban extracción de otros compuestos.

Los criterios de inclusión se enfocaron en las investigaciones más recientes, documentos que describen métodos de extracción específicamente orientados a colágeno y ácido hialurónico, así como artículos que incluyeran comparaciones de eficacia en estos procesos. Los artículos elegidos sobresalen por su importancia en el área de los métodos de extracción, su tenacidad científica y su práctica al objetivo de estudio.

Seguidamente, se identificaron y describieron los métodos de extracción más eficientes y comúnmente utilizados para obtener ácido hialurónico y colágeno. A partir de ello, se realizaron comparaciones que permitieron seleccionar el procedimiento más adecuado para su aplicación en un contexto experimental. A partir del análisis de las fuentes bibliográficas consultadas, se evidencia que no todos los artículos desarrollan el mismo procedimiento de extracción de ácido hialurónico y colágeno. Por el contrario, los estudios presentan una variedad de métodos, que incluyen técnicas físicas, químicas, enzimáticas y combinadas, dependiendo de la materia prima utilizada, los objetivos del estudio y las condiciones experimentales.

Entre los estudios más relevantes analizados se encuentran:

- (Agustín et al., 2022): Elaboración de un spray facial a base de colágeno extraído de membranas testáceas, validando sus propiedades cosméticas.
- (Pérez, 2016) y (Fernández, 2021): Extracción de AH a partir de humor vítreo y cresta de gallo, aplicando hidrólisis enzimática y métodos químicos.
- (Batista et al., 2022): Métodos innovadores como el uso de solventes eutécticos profundos y extracción con fluidos supercríticos para obtener colágeno de origen marino.
- (Mensah et al., 2023): Evaluación de la membrana testácea como biomaterial por su contenido en colágeno, AH y otros bioactivos.
- (Cobeñas-Dueñas, 2022) y (Quintero & Zapata, 2017): Métodos de extracción ácida, básica y enzimática de colágeno en especies marinas.
- (Beltrán Ramírez, 2021): Realización de un estudio para el desarrollo de un biomaterial de cáscara de huevo.

A continuación, se muestra la **tabla 2**, la cual resume y compara los principales métodos de extracción de ácido hialurónico y colágeno descritos. El objetivo es identificar las ventajas y

desventajas de cada técnica con base en su eficiencia, viabilidad técnica y aplicabilidad. Esta comparación permite contextualizar el método seleccionado para el estudio: la extracción química mediante hidrólisis ácida con HCl; en relación con otras alternativas disponibles, facilitando así un análisis más integral sobre su pertinencia y sostenibilidad.

Tabla 2 comparación de métodos de extracción de ácido hialurónico y colágeno

Métodos de extracción	Ventajas	Desventajas
Extracción química con hidrólisis ácida (HCl)	Método económico, eficaz para liberar compuestos bioactivos	Puede degradar proteínas si no se controla adecuadamente el pH y el tiempo
Hidrólisis enzimática	Alta eficiencia, mantiene la estructura del colágeno, método biocompatible	Costoso por el uso de enzimas, difícil de escalar
Extracción con pepsina	Incrementa el rendimiento del colágeno, no daña la triple hélice	Enzimas costosas, requiere precisión técnica
Extracción con disolventes eutécticos (DES)	Alta eficiencia (~90%), sostenible, no tóxico	Proceso prolongado, posible degradación proteica
Extracción asistida físicamente	Aumenta rendimiento y velocidad, mejora solubilización	Requiere equipos especializados y mayor control técnico
Extracción con fluidos supercríticos	Alta selectividad, proceso “verde”	Alto costo de operación, infraestructura especializada
Extrusión - hidroextracción	Alta eficiencia, producción continua	Equipamiento costoso, requiere filtración posterior
Solubilización en sal	Fácil implementación, bajo costo	Muy bajo rendimiento (~2%)

Esta comparación evidencia que el método de **hidrólisis ácida con HCl**, aunque no es el más avanzado, representa una opción **viable, accesible y eficiente** para contextos con recursos limitados, como el caso del estudio realizado en Aguachica-Cesar. Si bien otros métodos ofrecen mayor pureza o sostenibilidad, su **alto costo o complejidad técnica** los vuelve menos aplicables a pequeña escala.

Con el propósito de realizar un análisis técnico comparativo de los distintos métodos de extracción de ácido hialurónico (AH) y colágeno, se elaboró una matriz de evaluación basada en cinco criterios clave: eficiencia, rendimiento, viabilidad técnica, costo y sostenibilidad.

Para facilitar la comparación, se utilizó una escala de valoración del 1 al 5, donde:

- 1 = Muy bajo / Deficiente
- = Bajo / Poco favorable
- = Medio / Aceptable
- = Bueno / Recomendable
- = Muy bueno / Altamente recomendable

Cada criterio recibió un porcentaje de ponderación basado en su nivel de impacto dentro del proceso general de extracción:

- Eficiencia (25%): Mide qué tan eficaz es el método para aislar el compuesto deseado sin alteraciones significativas.
- Rendimiento (20%): Evalúa la cantidad de producto obtenido en relación con la materia prima procesada.
- Viabilidad técnica (20%): Considera la facilidad de implementación en condiciones de laboratorio, accesibilidad de materiales y control de variables.
- Costo (20%): Refleja la inversión requerida en insumos, equipos y personal técnico.
- Sostenibilidad (15%): Analiza el impacto ambiental, uso de recursos y potencial de reaprovechamiento de residuos.

La **tabla 3** presenta la matriz que permite realizar una evaluación comparativa de los métodos de extracción analizados, que respalda la elección del método más adecuado para este estudio, basado en datos revisados en la literatura científica contenida en el cuerpo del trabajo.

Tabla 3 Matriz de evaluación de métodos de extracción de ácido hialurónico y colágeno.

Métodos de extracción	Eficiencia (25%)	Rendimiento (20%)	Viabilidad técnica (20%)	Costo (20%)	Sostenibilidad (15%)
Extracción química con HCl	4	4	5	5	4
Hidrólisis enzimática	5	5	3	2	5
Extracción con pepsina	5	4	3	2	4
Disolventes eutécticos profundos (DES)	5	5	3	3	5
Extracción asistida físicamente	5	5	4	3	4
Fluidos supercríticos	5	5	2	1	5
Extrusión - hidroextracción	4	4	3	2	4
Solubilización en sal	2	2	4	5	3

La matriz permite visualizar que, aunque hay métodos más modernos y sostenibles, la **extracción con HCl** ofrece un **buen equilibrio entre eficiencia, viabilidad y costo**, lo cual justifica su selección para estudios técnicos como el realizado en Aguachica-Cesar.

Dentro de la literatura no hay un método de extracción de ácido hialurónico y colágeno a base de las membranas testáceas y cascaras de huevo de gallina. Por lo tanto, con base en la investigación realizada, se planteó la implementación de un método de extracción química mediante hidrólisis ácida, adaptado a las condiciones del laboratorio de la Universidad Popular del Cesar, Seccional Aguachica. Este método fue seleccionado por ser accesible en cuanto a materiales y condiciones de trabajo, además de estar respaldado por la literatura científica.

En particular, se tomó como referencia el procedimiento propuesto por Benítez (2000), complementado con otros estudios que describen técnicas de análisis similares bajo condiciones controladas. A continuación, mencionamos la guía de laboratorio a realizar.

3.2.1 Materiales necesarios

- Cáscaras y membranas de huevo (trituradas lo más finas posibles)
- Agua destilada
- Ácido clorhídrico (HCl) diluido (0.1-1%)
- Ácido acético (5-10%)
- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Solución salina (cloruro de sodio)
- Recipientes de vidrio (vasos de precipitado, matraces, Erlenmeyer, tubos de ensayo)
- Equipos de filtración (embudos, papel filtro)
- Balanza
- pH-metro
- Plancha de calentamiento
- Agitador y termómetro

3.2.2 Preparación de las membranas testáceas y cáscaras de huevo

Lavar y secar las cáscaras y membranas a temperatura ambiente. Luego, se trituran lo más finas posibles.

Seguidamente, se pesa la materia prima para cada uno de los lotes a evaluar.

A continuación, la **tabla 4** presenta la distribución de los tratamientos aplicados a cada uno de los lotes experimentales. Se utilizaron tres lotes, a los cuales se le aplicaron cuatro tratamientos diferenciados por cantidades específicas de la materia prima.

Tabla 4 tratamientos y lotes

Lotes	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3	Tratamiento 4
Lote 1	150 gr	200 gr	250 gr	300 gr
Lote 2	150 gr	200 gr	250 gr	300 gr
Lote 3	150 gr	200 gr	250 gr	300 gr

Esta distribución permite comparar los efectos de las distintas dosis en condiciones controladas, asegurando la repetitividad y confiabilidad del experimento.

Se adiciona una solución de ácido clorhídrico diluido (0.1–1 %p/v) y se deja en reposo durante 24 horas. El HCl cumple la función de desmineralizar las cáscaras de huevo, eliminando el carbonato de calcio (CaCO_3) y facilitando así la extracción de las proteínas presentes en la membrana testácea. La solución se diluye en ese rango de concentración para evitar una degradación excesiva de las proteínas, ya que concentraciones más altas pueden hidrolizar tanto el colágeno como el ácido hialurónico (Benitez, 2000). A continuación, se procedió al filtrado de la mezcla para separar los residuos insolubles.

Al líquido obtenido se le adiciona ácido acético (5-10%p/v). Este disuelve las proteínas estructurales y facilita la solubilización del colágeno al romper enlaces intermoleculares (Kheirabadi, 2018). Además, el ácido acético (5–10% p/v) se utiliza en algunas formulaciones como agente regulador de pH para mantener la estabilidad del ácido hialurónico, dado que este biopolímero es sensible a la hidrólisis en condiciones de pH extremo (Tsao, 2012).

Se calienta la mezcla a una temperatura entre 60 y 70 °C durante un período de 2 a 4 horas. Este calentamiento controlado permite la desnaturalización progresiva de las proteínas, siendo un paso crucial para facilitar la extracción y solubilización del colágeno y el ácido hialurónico. El calor rompe las interacciones no covalentes de las proteínas, lo que favorece la

liberación de ambos compuestos desde la membrana testácea (Kheirabadi, 2018). Además, la solubilidad aumenta, porque las proteínas son más solubles en medios calientes y ácidos, facilitando la reacción del ácido acético con el colágeno. A temperaturas menores, la reacción puede ser más lenta y menos efectiva. Por otra parte, el tiempo de calentamiento utilizado es suficiente para solubilizar el colágeno y el ácido hialurónico sin degradarlos, pues durante ese intervalo se permite la acción del ácido acético sin dañar la estructura del colágeno (Thuanthong et al., 2016).

Después del calentamiento, se reposó un poco y se le adiciona cloruro de sodio hasta alcanzar la saturación. Luego, se reposa la mezcla en refrigeración, para que el AH precipite. Seguidamente, se filtra la mezcla para recolectar el AH, se lava con agua destilada y se deja secar (Eyre DR & Al, 1978).

Al residuo restante se le ajusta el pH a un valor neutro mediante la adición lenta y controlada de hidróxido de sodio (NaOH) (Limroongreungrat et al., 2011). Para evaluar la efectividad del método químico aplicado en la extracción de colágeno y ácido hialurónico a partir de cáscaras y membranas testáceas de huevo, se tomaron como referencia los criterios metodológicos propuestos por Pérez-Gumeta et al. (2018). Para precipitar el colágeno, se añade una solución salina saturada y se deja en reposo en refrigeración. Seguidamente, la mezcla es filtrada para recolectar el colágeno; luego, se lava con agua destilada y se deja secar (Cao et al., 2023). Las muestras obtenidas se almacenaron en tubos de ensayo con tapas, los cuales estaban limpios y secos, además, se almacenaron en un lugar oscuro.

Para evaluar la efectividad del método químico aplicado en la extracción de colágeno y ácido hialurónico a partir de cáscaras y membranas testáceas de huevo, se tomaron como referencia los criterios metodológicos propuestos por Pérez-Gumeta et al. (2018). En su estudio, estos autores compararon diferentes métodos de extracción y evaluaron su rendimiento con base

en la cantidad de biocompuestos obtenida y la viabilidad del proceso, lo que permitió establecer parámetros objetivos para valorar la eficiencia de cada técnica. Siguiendo esta línea, en el presente trabajo se cuantificó el material recuperado y se analizó la coherencia del procedimiento químico adoptado, considerando tanto el rendimiento como la adecuación al contexto experimental. Esta referencia metodológica respaldó la selección y aplicación del enfoque desarrollado, aportando una base científica sólida para su implementación y posterior análisis comparativo (Pérez-Gumeta, 2018)

3.3 Evaluar la efectividad técnica del método seleccionado para la extracción de ácido hialurónico y colágeno

Con el propósito de evaluar la efectividad de esta metodología, se elaboró un método práctico basándose en la unión de datos recopilados de distintas publicaciones de fuentes académico y científico.

Para llevar a cabo el método de extracción química mediante hidrólisis ácida, la materia prima (cáscaras de huevo con membrana testácea) fue sometida a un lavado manual con agua potable, seguido de un secado natural a temperatura ambiente durante aproximadamente una semana, con el fin de evitar la degradación térmica de los compuestos. Posteriormente, se trituraron mecánicamente hasta obtener un polvo fino. En total, se recolectaron y procesaron 11,049 kg de materia prima seca.

Preparación de la materia prima y diseño experimental: Para el proceso experimental, realizamos tres lotes (repeticiones) de cuatro tratamientos cada uno, con diferentes cantidades de la muestra. Esto se hizo con el fin de apreciar el efecto de las diferentes concentraciones de la materia prima en la variable de estudio. Las cantidades de cáscaras y membranas utilizadas por cada tratamiento fueron 150g, 200g, 250g, 300g, para un total de 2700 g de muestra por los cuatro lotes. Estas proporciones abarcan un área progresiva y significativa, permitiendo la

identificación de posibles cambios en los resultados conforme aumenta la cantidad de muestra, lo que confirma un análisis comparativo entre ellas.

Desmineralización con ácido clorhídrico (HCl): En la imagen 1 y 2 se ilustra el procedimiento de desmineralización de las cáscaras de huevo mediante el uso de ácido clorhídrico diluido, paso clave para facilitar la extracción de colágeno y ácido hialurónico presentes en la membrana testácea.

Seguidamente del pesado, se preparó una solución de 500ml de ácido clorhídrico diluido (0.1-1%p/v) (Benitez, 2000) como se muestra en la **imagen 1**. A esta solución, se le adicionaron las cascaras de huevo ya pesadas y se dejó en reposo durante 24 h.



Imagen 1 Preparación de la solución de HCl diluido



Imagen 2 Adición de cáscaras de huevo al ácido clorhídrico

El HCl, como se muestra en la **imagen 2**, Ayuda a desmineralizar las cáscaras de huevo, eliminando carbonato de calcio (CaCO_3) y facilitando la extracción de las proteínas de la membrana testácea y se diluye (0.1-1%p/v) para evitar una degradación excesiva de las proteínas. Ya que, concentraciones más altas pueden hidrolizar el colágeno y el ácido hialurónico (Benitez, 2000). Pasado el tiempo de reposo, se procedió a filtrar la mezcla para separar los residuos insolubles.

3.3.3 Solubilización proteica y aplicación de calor controlado: Una vez desmineralizadas las cáscaras, el siguiente paso consiste en facilitar la disolución de las proteínas

estructurales mediante la adición de ácido acético y la aplicación de calor. Estas condiciones favorecen la liberación de los biocompuestos deseados.



Imagen 3 Adición de ácido acético al extracto líquido para favorecer la solubilización del colágeno y estabilizar el ácido hialurónico



Imagen 4 Calentamiento controlado de la mezcla entre 60 y 70 °C para facilitar la desnaturalización y extracción de proteínas.

Al líquido obtenido se le adiciono ácido acético (5-10%p/v), como se muestra en la **imagen 3**. Este disuelve las proteínas estructurales y facilita la solubilización del colágeno al romper enlaces intermoleculares (Kheirabadi, 2018). Además, el ácido acético (5–10%p/v) se utiliza en algunas formulaciones como agente regulador de pH para mantener la estabilidad del ácido hialurónico, dado que este biopolímero es sensible a la hidrólisis en condiciones de pH extremo (Tsao, 2012).

Se continuó, con el calentamiento de la mezcla entre 60-70 °C durante 2- 4 h, como se muestra en la **imagen 4**. El calentamiento entre estas temperaturas ayudó a la desnaturalización controlada de las proteínas, siendo este paso crucial para facilitar la extracción y solubilización del colágeno y el ácido hialurónico. Debido a que, el calor rompe las interacciones no covalentes de la proteína, favoreciendo la liberación del colágeno y del ácido hialurónico de la membrana testácea (Kheirabadi, 2018). Además, la solubilidad aumenta, puesto que las proteínas son más solubles en medios calientes y ácidos, facilitando la reacción del ácido acético con el colágeno. A temperaturas menores, la reacción puede ser más lenta y menos efectiva. Por otra parte, el tiempo

de calentamiento es el suficiente para solubilizar el colágeno y el AH sin degradarlos, considerando que, en ese tiempo se permite la acción del ácido acético sin dañar la estructura del colágeno (Thuanthong et al., 2016).

Precipitación y recuperación de los biocompuestos: La etapa final del proceso consistió en la recuperación y purificación de los compuestos extraídos mediante técnicas de precipitación química, utilizando cloruro de sodio y ajuste de pH.

En las **imágenes 5 y 6** se muestran dos etapas consecutivas y fundamentales para la



Imagen 5 Adición de cloruro de sodio para saturar la solución y precipitar el ácido hialurónico



Imagen 6 Ajuste de pH y precipitación del colágeno mediante solución salina saturada.

precipitación y recuperación del ácido hialurónico y el colágeno durante el proceso de extracción

Después del calentamiento, se reposó un poco y se le adicionó cloruro de sodio hasta alcanzar la saturación, como se muestra en la **imagen 5**. Luego, se reposa la mezcla en refrigeración, para que el AH precipite. Seguidamente, se filtra la mezcla para recolectar el AH, se lava con agua destilada y se deja secar (Eyre DR & Al, 1978).

Al sobrante, se le ajusta PH a neutro, agregando hidróxido de sodio (NaOH) muy despacio (Limroongreungrat et al., 2011), como se muestra en la **imagen 6**. Para precipitar el colágeno, se añade una solución salina saturada y se deja en reposo en refrigeración. Seguidamente, la mezcla es filtrada para recolectar el colágeno. Luego, se lava con agua destilada y se deja secar (Cao et al., 2023).

Las muestras obtenidas se almacenaron en tubos de ensayo limpios, secos y tapados,

colocados en un ambiente oscuro para su conservación.

3.3.1 Análisis de efectividad del proceso

Para comprobar la presencia de ácido hialurónico y colágeno en las muestras extraídas, se realizaron análisis fisicoquímicos y microbiológicos. Estos análisis permiten validar la efectividad del protocolo químico aplicado, asegurando que los biocompuestos fueron extraídos de forma adecuada, sin contaminación y con características aptas para su evaluación posterior en términos de calidad y pureza.

3.3.2 Resultados de la extracción: peso de las muestras

La primera etapa del análisis consistió en el pesado de las muestras obtenidas tras el proceso de extracción química, se llevó a cabo con una balanza analítica; sin embargo, como la muestra era muy poca, no alcanzaba a mover el medidor. Debido a que la cantidad de ácido hialurónico y colágeno extraída fue muy baja para cada tratamiento, se decidió unir cada tratamiento con los tres lotes, Las siguientes **tablas 5 y 6** resume el total de gramos extraídos por tratamiento, tanto para ácido hialurónico como para colágeno.

Tabla 5 Sumatoria de las muestras ácido hialurónico

ÁCIDO HIALURONICO				
Lotes	Tratamiento 1 de 150 g	Tratamiento 2 de 200 g	Tratamiento 3 de 250 g	Tratamiento 4 de 300 g
Lote 1	0.04 g	0.09 g	0.11 g	0.12 g
Lote 2	0.10 g	0.06 g	0.06 g	0.10 g
Lote 3	0 g	0.02 g	0 g	0.03 g
Peso Total	0.14 g	0.17 g	0.17 g	0.24 g

Tabla 6 Sumatoria de las muestras colágeno

COLÁGENO				
Lotes	Tratamiento 1 de 150 g	Tratamiento 2 de 200 g	Tratamiento 3 de 250 g	Tratamiento 4 de 300 g
Lote 1	0 g	0 g	0 g	0 g
Lote 2	0 g	0 g	0.04 g	0 g
Lote 3	0 g	0 g	0 g	0 g

Peso Total	0.01 g	0.01 g	0.04 g	0.01 g
-------------------	--------	--------	--------	--------

Como se observa en la **Tabla 5**, el tratamiento que produjo mayor cantidad de ácido hialurónico fue el de 300 g (0.24 g), seguido por los tratamientos de 200 g y 250 g. Por el contrario, la **Tabla 6** muestra una producción significativamente menor de colágeno, siendo el tratamiento de 250 g el único que registró una cantidad destacable (0.04 g). Esto refleja que el rendimiento del ácido hialurónico fue superior al del colágeno en casi todos los tratamientos

3.3.3 Medición de pH en las muestras

Para llevar a cabo la medición del pH, se calibra en pH-metro utilizando soluciones buffer con valores de pH 4, 7 y 10. Una vez calibrado el equipo, se pesa exactamente 0.1 g de la muestra y se coloca en un vaso de precipitado. A continuación, se adiciona 10 ml de agua destilada y se mezcla la solución, ya sea de forma manualmente o con agitador magnético, hasta obtener una mezcla homogénea. Una vez homogenizada, se introduce el electrodo de pH-metro en la solución y se espera a que el valor se estabilice para registrar la lectura. Posteriormente, se enjuaga el electrodo con agua destilada antes de proceder con la medición del pH de las demás muestras (Arnold & Rupert, 2008).

A continuación, se muestra la **tabla 7** los resultados obtenidos de la prueba de pH realizada a cada muestra de colágeno y ácido hialurónico.

Tabla 7 de resultados de hp

TABLA DE RESULTADOS DE PH				
pH	Tratamiento 1 de 150 g	Tratamiento 2 de 200 g	Tratamiento 3 de 250 g	Tratamiento 4 de 300 g
pH de Ácido Hialurónico	6.01	6.07	6.01	6.06
pH de Colágeno	5.90	5.92	5.92	5.90

Los valores obtenidos indican que el pH de las muestras de ácido hialurónico se mantuvo

entre 6.01 y 6.07, mientras que las muestras de colágeno mostraron un pH más ácido, entre 5.90 y 5.92. Estas diferencias reflejan las propiedades propias de cada compuesto.

3.3.4 Ensayo de Biuret (Determinación de Proteínas)

Con el fin de identificar la presencia de proteínas, se aplicó la prueba de Biuret. Se pesan 0,05 g de la muestra y se transfiere a un tubo de ensayo limpio. Posteriormente, se adicionan 5 ml de agua destilada y se agita hasta lograr la disolución completa de la muestra. A continuación, se agregan 2 ml del reactivo de Biuret previamente preparado y se agita suavemente hasta obtener una mezcla homogénea. Se observa la coloración de la solución: la aparición de una tonalidad violeta nos indicando la presencia de enlaces peptídicos, lo cual es indicativo de proteínas o colágenos. Finalmente, se registran la intensidad del color observado(Layne, 1957).

Como resultado La muestra correspondiente al tratamiento de 250 g presentó una coloración violeta más intensa, indicando una mayor concentración de proteínas. Las muestras de 200 g y 300 g también presentaron coloraciones, aunque más tenues. La de 150 g no mostró cambios, lo cual sugiere una concentración de proteínas no detectable mediante este método.

3.3.5 Identificación de ácido hialurónico: método físico-sensorial y azul de metileno

Para verificar la presencia de ácido hialurónico en las muestras obtenidas, se llevaron a cabo dos ensayos consecutivos: una evaluación físico-sensorial y una prueba de reacción con azul de metileno. Ambos procedimientos se documentaron en las **imágenes 7, 8 y 9**.

La primera prueba consiste en observar la consistencia de las muestras para determinar si la muestra contiene ácido hialurónico, en tubos de ensayo se agrega la muestra, agregándole un 1 ml agua destilada, se agita hasta disolver la muestra, se pudo apreciar una consistencia viscosa(Cowman et al., 2015). El cual nos indica la presencia de ácido hialurónico.

La muestra que mayor tuvo presencia de ácido hialurónico es la muestra de concentración de 300g, como se puede apreciar en **la imagen 7**, seguida por las de 250 g, 200 g y 150 g, en las que también se evidenció ácido hialurónico, aunque en menor cantidad.



Imagen 7 Observación físico-sensorial de la viscosidad en las muestras.



Imagen 8 Adición de azul de metileno a las muestras.

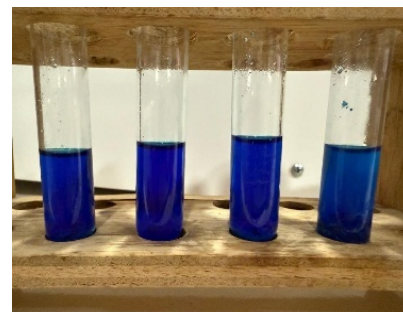


Imagen 9 Formación del precipitado gelatinoso tras reacción con azul de metileno y alcohol.

Posteriormente, se aplicó la prueba de visualización con azul de metileno (Pearse, 1980). Se utilizaron las mismas muestras contenidas en los tubos de ensayo. Como se muestra en la **imagen 8**, se añadieron tres gotas de azul de metileno a cada muestra. Luego, se agitaron y se dejaron reposar durante un minuto para permitir la interacción del colorante. A continuación, como se observa en la **imagen 9**, se añadieron de 3 a 5 ml de alcohol etílico al 50% (Laurent & Fraser, 1992) y se dejaron en reposar por tres minutos. Finalizado este tiempo se observaron precipitados gelatinosos en todas las muestras, lo que confirma la presencia de ácido hialurónico.

Las imágenes muestran la diferencia en viscosidad y formación de precipitado entre las muestras. El tratamiento de 300 g presentó mayor viscosidad y formación de gel, lo que confirma una concentración más alta de ácido hialurónico. Las muestras de 250 g y 150 g también presentaron resultados positivos, aunque menos marcados. La muestra de 200 g mostró viscosidad al tacto pero no reacción intensa con azul de metileno.

Observación microscópica de las muestras

Para la observación microscópica de la muestra, se tomar una pequeña cantidad de la

muestra en seco utilizando una espátula y se deposita en el centro de un portaobjeto limpio. Posteriormente, se añade una gota pequeña de agua destilada con el fin de suspender la muestra, y se cubrir cuidadosamente con un cubreobjetos sobre las muestras, evitando la formación de burbujas. Se observa bajo el microscopio utilizando los aumentos necesarios hasta lograr una visualización clara de la estructura. Una vez enfocada la muestra, se procede a describir las características morfológicas observadas, tales como el tamaño, forma, estructura y distribución de las partículas (Cappuccino - microbiology - a laboratory manual - 11ed - 2017, n.d.).

3.3.6 Pruebas Microbiológicas

Para realizar las pruebas microbiológicas a las muestras obtenidas previamente mediante un proceso químico, se emplearon dos medios de cultivos: **Sabouraud Glucose Agar (SGA)** y **Standard Methods Agar (SMA)**. Se prepararon 200 ml de cada medio, y la cantidad de agar requerida se calculó mediante una regla de tres, tomando como referencia la concentración indicada en el envase de cada uno (Mary Jo Zimbardo et al., 2013).

En el caso del SGA se indica que se utilizan 65 g/L, se calcula:

$$\left(\frac{65g}{1000ml} \right) * 200ml = 13g \text{ de polvo}$$

Lo cual nos indica que se utilizó 13 g de Sabouraud Glucose Agar.

Para el SMA se indica en el recipiente que se utiliza 22.5 g/l, el cálculo fue:

$$\left(\frac{22.5g}{1000ml} \right) * 200ml = 4.5g \text{ de polvo}$$

Así se utilizó 4.5 g de Standard Methods Agar.

Medio	Agua destilada	Polvo de medio
Sabouraud Glucose Agar	200 ml	13 g

Standard Methods Agar	200 ml	4.5 g
-----------------------	--------	-------

Tabla 8 Resumen final: porcentajes de medios de cultivos

En la **tabla 8** se muestra un **resumen cuantitativo** de los medios de cultivo utilizados en las pruebas microbiológicas realizadas en el estudio. Se presentan las cantidades específicas de **agua destilada** y **polvo del medio** requeridas para preparar 200 ml de cada medio.

3.3.7 Descripción y función de cada medio:

Sabouraud Glucose Agar (SGA)

Es un medio especializado en el crecimiento de hongos, como **levaduras y mohos**. Su alto contenido de glucosa y su pH ácido favorecen el desarrollo de estos microorganismos mientras inhiben el crecimiento bacteriano.

Standard Methods Agar (SMA)

Este medio se emplea para el recuento total de **bacterias aerobias mesófilas**. Es comúnmente utilizado en la industria alimentaria y en análisis microbiológicos de calidad.

Una vez obtenida la cantidad necesaria de cada medio, se procedió a la preparación dos Erlenmeyer de 500 ml. Para la preparación de Sabouraud Glucose Agar: se disolvieron 13 g en 200 mL de agua destilada, calentar hasta disolver completamente y esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos. Para Standard Methods Agar: se disolvieron 4.5 g en 200 mL de agua destilada, como se muestra en la **tabla 6**, se calentó hasta su completa disolución y se esterilizo en las mismas condiciones (Mary Jo Zimbardo et al., 2013).

Una vez esterilizados, Se procede a verter los medios estériles en placas Petri bajo condiciones asépticas. Una vez los medios de cultivos estén listos, se procede a preparar la suspensión de la muestra. Para ello, se suspenden **0.1 g** de muestra en 9 ml de la solución de **Lactato de Ringer 1/4 estéril**, y se agita durante un minuto (Hu et al., 2013). Posteriormente, se procede a sembrar **0.1 ml** de la suspensión en una caja o placa con SMA, destinado al

crecimiento de bacteria y en cajas Petri con SGA, para el crecimiento de mohos y levaduras. La muestra se extiende uniformemente con un asa de Digralsky previamente esterilizada al rojo vivo. Se proceden a incubar los medios de cultivos a 37° c los SMA por 24-48 horas a 25-28° los SGA por 3-5 días. Finalizando el periodo de incubación, se procede al conteo de colonias formadoras de unidades y determinar que microorganismos están presentes macroscópicamente.

3.3.8 Resultados de pruebas microbiológicas

Se realizaron pruebas microbiológicas a muestras de polvo extraídas de cáscaras de huevo, procesadas químicamente para obtener ácido hialurónico (AH) y colágeno (C) en concentraciones de 150g, 200g, 250g y 300g. Las muestras se sembraron en medios Sabouraud Glucose Agar (SGA) y Standard Methods Agar (SMA) para observar el crecimiento de hongos y bacterias respectivamente.

El objetivo fue identificar el patrón de crecimiento microbiano y evaluar la posible actividad antimicrobiana de los extractos en función de la cantidad de biomaterial utilizado en su obtención.

Las concentraciones (150g, 200g, 250g, 300g) corresponden a la cantidad de materia prima utilizada para elaborar el polvo. El crecimiento observado en las placas se evaluó en función del número, tamaño y densidad de colonias formadas, no en gramos.

Las muestras fueron inoculadas por duplicado en medios de cultivo (SGA para hongos y SMA para bacterias) e incubadas bajo condiciones controladas.

3.3.9 Resultados macroscópicos

Imágenes macroscópicas y microscópicas en medio SGA (hongos)

Las siguientes **imágenes 10** y **11** corresponden al análisis de crecimiento fúngico en medio SGA (Sabouraud Glucose Agar) a partir de la muestra de ácido hialurónico con una concentración de 150 g. Se buscó evidenciar la presencia de estructuras típicas de hongos

ambientales.



Imagen 10 (SGA, 150g AH)
macroscópicas. Colonias algodonosas
dispersas

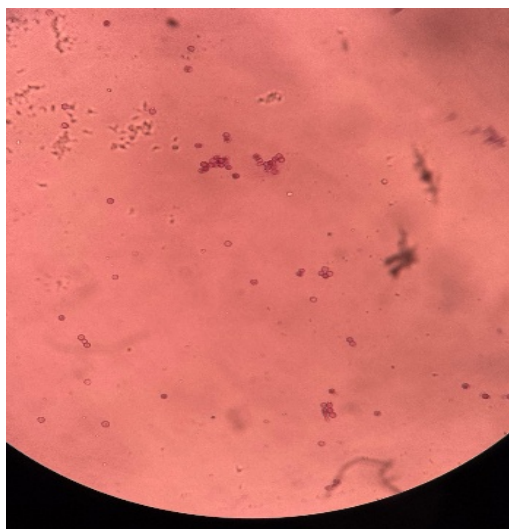


Imagen 11 (SGA, 150g AH)
microscópicas. Hifas delgadas y
septadas

En la **imagen 10**, se observa crecimiento, con colonias dispersas de aspecto algodonoso, típico de hongos ambientales como *Penicillium*. En la **imagen 11**, se evidencian hifas delgadas, septadas. Morfología compatible con hongos ambientales. Esto se obtuvo de la muestra de ácido hialurónico concentración 150 gr del medio SGA.

A continuación, en la **imagen 12 y 13** se presenta el crecimiento fúngico observado en otra muestra de ácido hialurónico (misma concentración), donde se evidencia la morfología compacta de colonias algodonosas y estructuras características del género *Aspergillus*.



Imagen 12 (SGA, 200g AH)
macroscópicas. Colonias de bordes
irregulares, aspecto compacto

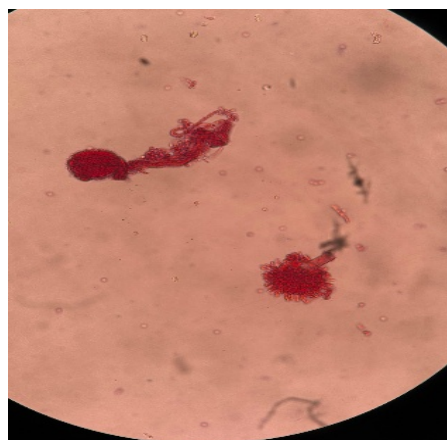


Imagen 13: (SGA, 200g AH)
microscópicas. Conidióforo y esporas
compatibles con *Aspergillus* spp.

En contraste, la **imagen 12** presenta colonias con bordes irregulares. Estructuras algodonosas compactas. Del mismo modo, en la **imagen 13** se evidencian hifas de mohos y presencia de esporas, conidióforo compatible con *Aspergillus spp.* característico de mohos ambientales.

En esta sección se documenta el comportamiento de los hongos a concentraciones más altas de ácido hialurónico (250 y 300 g), donde se presentan patrones de crecimiento densos y formas de diseminación por swarming.

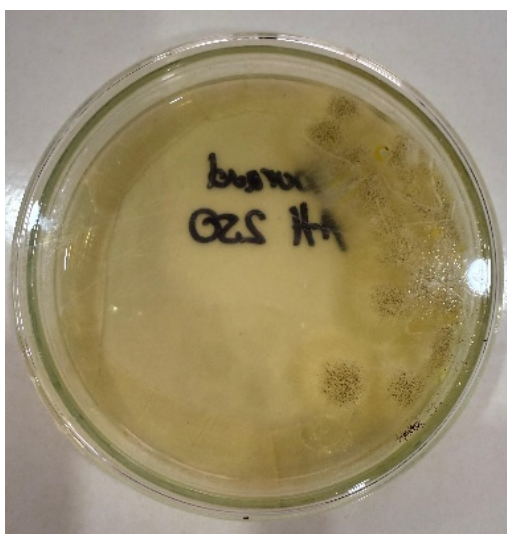


Imagen 14 (SGA, 250g AH) macroscópicas. Micelio superficial denso

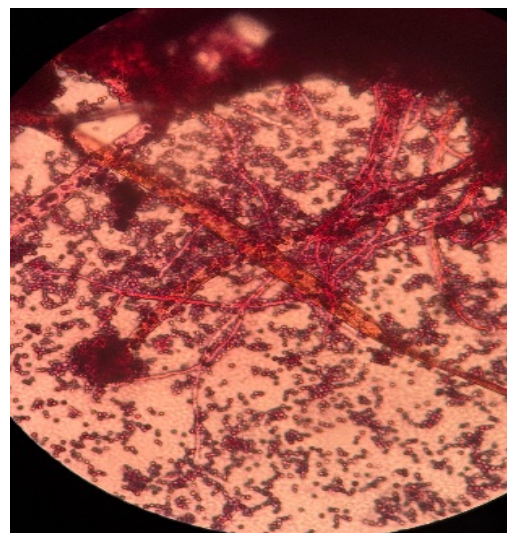


Imagen 15 (SGA, 250g AH) microscópicas. Desarrollo micelial característico de Aspergillus spp.

Asimismo, en la **imagen 14** se evidencio crecimiento de colonias densas, con micelio superficial extenso. Sin embargo, la muestra de ácido hialurónico de concentración 250 gr confirma la presencia de Micelio denso y desarrollado, compatible con *Aspergillus spp.* Ver **imagen 15**.

Estas imágenes documentan la invasión del medio por crecimiento tipo swarming, típico de hongos ambientales, y estructuras poco definidas que sugieren contaminación externa en muestras concentradas de 300 g.

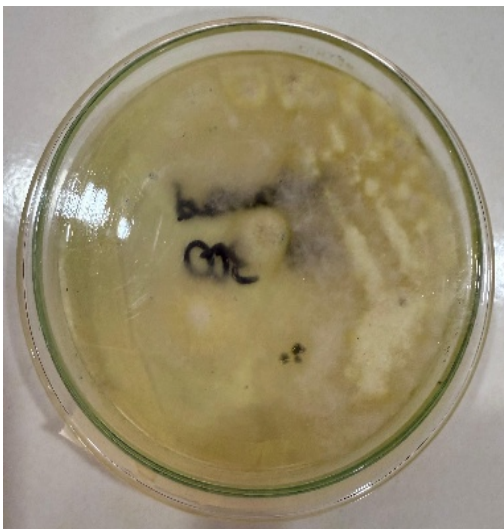


Imagen 16 (SGA, 300g AH) macroscópicas. Crecimiento tipo swarming

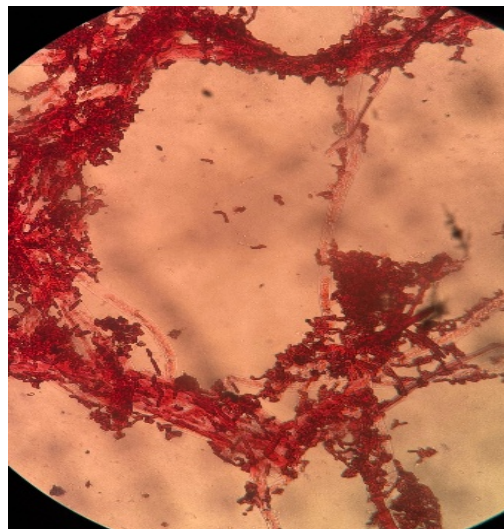


Imagen 17 (SGA, 300g AH) microscópicas. Hifas septadas y esporas

Además, en la **imagen 16**, se nota crecimiento tipo swarming, característico de contaminación ambiental, este tipo de crecimiento invade toda la superficie del agar como una telaraña e impide que se pueda observar crecimiento de otras colonias. Además, en la muestra de ácido hialurónico concentrado a 300 gr se consta la presencia de hifas septadas y esporas, características de mohos. Ver **imagen 17**.

En las siguientes muestras, se registran colonias con pigmentación marrón y textura seca, además de estructuras borrosas que dificultan la identificación precisa, posiblemente atribuibles a contaminación.



Imagen 18 (SGA, 250g C) macroscópicas. Colonias marrones, bordes definidos

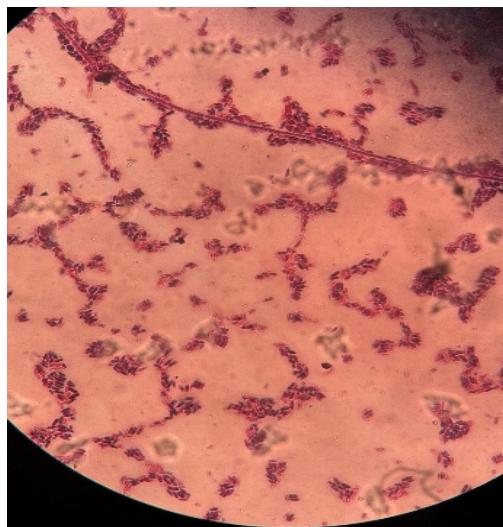


Imagen 19 (SGA, 250g C) microscópicas. Estructuras borrosas, posible contaminación ambiental

Como se puede apreciar en la **imagen 18**, hay presencia de colonias con bordes bien definidos, pigmentación marrón y textura seca. De igual modo, la imagen es poco clara y no se logra detallar bien las estructuras presentes, pueden ser burbujas y contaminantes del ambiente, se logran observar algunas estructuras reproductivas de mohos. Ver **imagen 19**

En estas **imágenes 20 y 21**, se documenta bajo crecimiento de colonias y la presencia de estructuras poco claras. Se considera una posible influencia de la calidad del medio o condiciones ambientales durante la incubación.

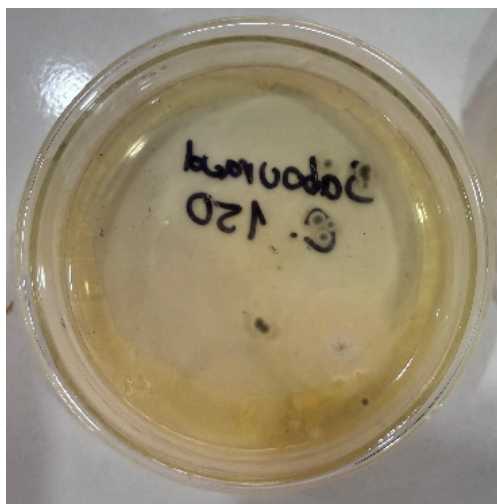


Imagen 20 (SGA, 150g C) macroscópicas. Colonias pequeñas y dispersas

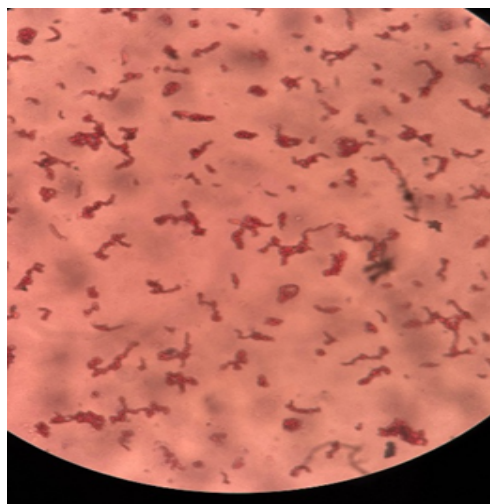
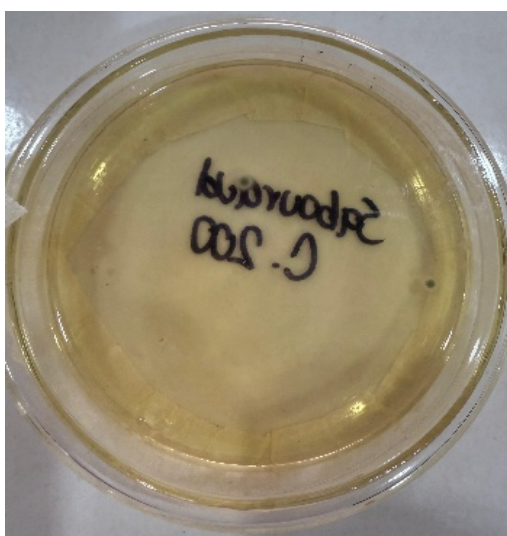


Imagen 21 (SGA, 150g C) microscópicas. Imagen borrosa, sin estructuras claras

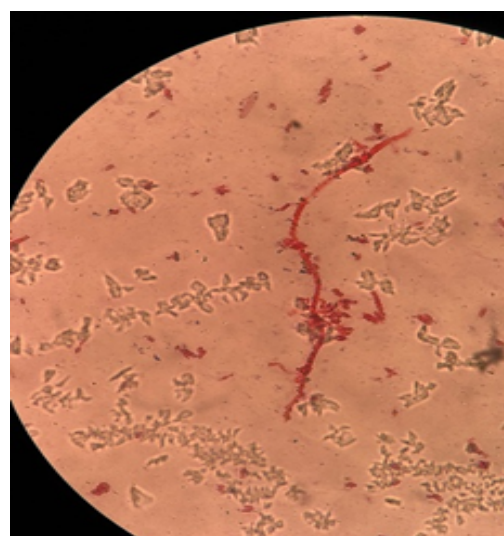
De igual manera, en la **imagen 20**, se puede apreciar colonias pequeñas y escasas.

Asimismo, la imagen poco clara y no se logra detallar bien las estructuras presentes, pueden ser burbujas y contaminantes del ambiente. Ver **imagen 21**.

En las **imágenes 22 y 23** siguientes pertenecen a cultivos de colágeno a concentración de 300 g, donde se aprecia el desarrollo típico de micelio filamentoso y colonias con pigmentación central oscura.



*Imagen 22 (SGA, 200g C)
macroscópicas. Colonias con micelio*



*Imagen 23(SGA, 200g C)
microscópicas. Imagen poco clara con
posibles burbujas*

Por otro lado, en la **imagen 22**, se observan dos colonias definidas, con micelio característico de mohos filamentosos. La imagen es poco clara y no se logra detallar bien las estructuras presentes, pueden ser burbujas y contaminantes del ambiente. Ver **imagen 23**.

Estas **imágenes 24 y 25**, corresponden al crecimiento fúngico observado en medios SGA inoculados con colágeno (300 g), donde se presenta una morfología clásica de mohos con centros oscuros y bordes blancos.

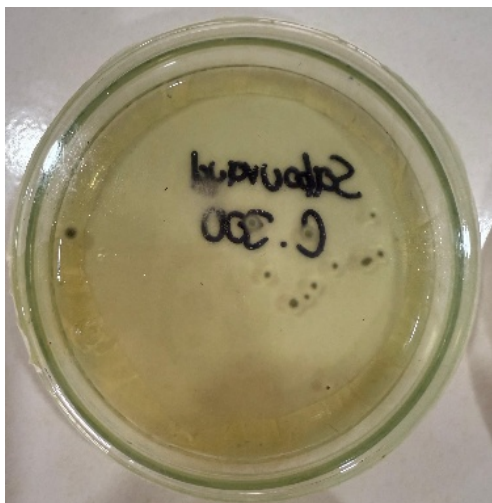


Imagen 24 (SGA, 300g C) macroscópicas. Colonias irregulares con borde blanco

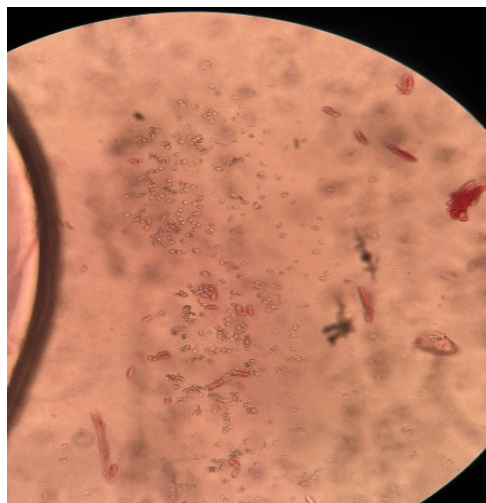


Imagen 25 (SGA, 300g C) microscópicas. Presencia de conidios y estructuras filamentosas

Del mismo modo, en la **imagen 24**, se aprecian, colonias irregulares, con borde blanco, centro de color oscuro. Cabe añadir que en la muestra de colágeno de 300gr, se observan conidios, mohos filamentosos. Ver **imagen 25**.

Imágenes macroscópicas y microscópica en medio SMA (bacterias)

En las muestras inoculadas en medio SMA con ácido hialurónico, se identificaron colonias bacterianas pequeñas, junto con la presencia de bacilos Gram positivos dispuestos en cadenas.

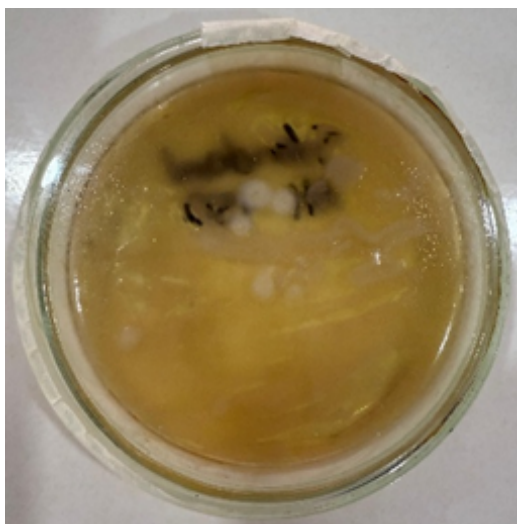


Imagen 26: (SMA, 150g AH) macroscópicas. Colonias pequeñas, redondas

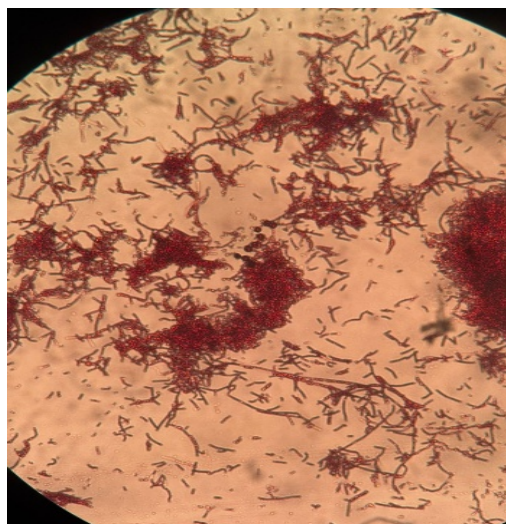


Imagen 27 (SMA, 150g AH) microscópicas. Bacilos Gram positivos en cadenas

Como se puede apreciar en la **imagen 26**, hay colonias pequeñas, redondas y translúcidas. La **imagen 27**, prueba la presencia de bacilos Gram positivos cortos, en cadenas.

A continuación, se presenta la observación de colonias cremosas, con presencia de bacilos Gram negativos, obtenida de la muestra de ácido hialurónico (200 g) en SMA. En **imágenes 28 y 29**.

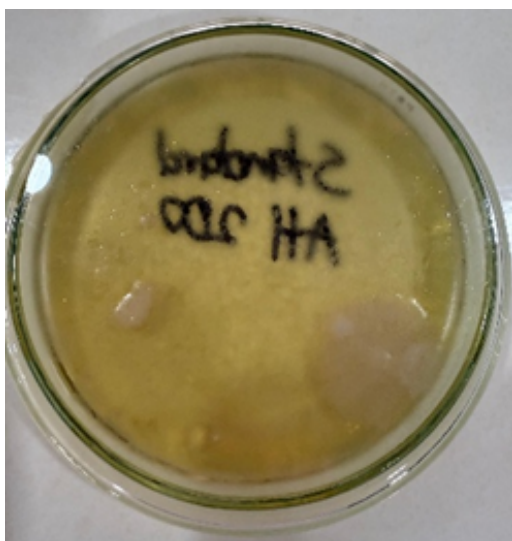


Imagen 28 (SMA, 200g AH) macroscópicas. Colonias mucoides y cremosas

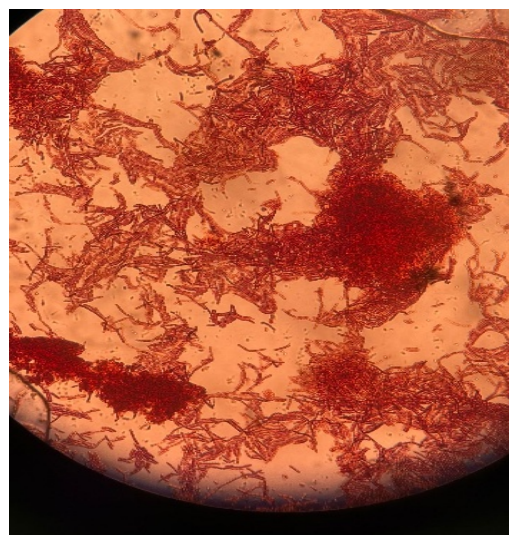


Imagen 29 (SMA, 200g AH) microscópicas. Bacilos Gram negativos largos y delgados

Sumado a esto, la **imagen 28** tiene colonias con borde mucoso y cremoso. En la muestra de ácido hialurónico concentración 200 gr del medio SMA, se evidencian bacilos Gram negativos largos y delgados. Ver **imagen 29**.

En estas **imágenes 30 y 31**, se evidencia una contaminación mixta bacteriana y fúngica en la muestra de ácido hialurónico (250 g), lo cual se refleja en la diversidad de colonias y morfologías observadas.

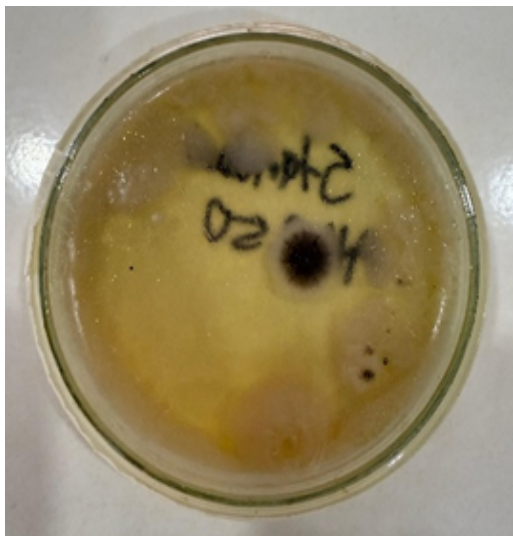


Imagen 30 (SMA, 250g AH) macroscópicas. Colonias de distintos

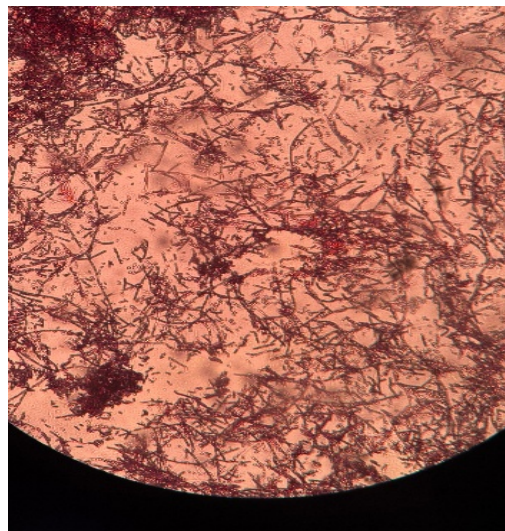


Imagen 31 (SMA, 250g AH) microscópicas. Bacilos Gram positivos y cocos Gram negativos

Incluso, en la **imagen 30**, se manifiestan varios tipos de colonias, predomina una colonia oscura con borde irregular característica de contaminación por mohos ambientales. Por otro lado, la muestra de ácido hialurónico concentración 250 gr manifiesta una mezcla de bacilos grampositivos y cocos gramnegativos. Ver **imagen 31**.

Las siguientes **imágenes 32 y 33**, representan el comportamiento bacteriano del colágeno (200 g) en medio SMA. Se observa presencia de cocos y dificultades para determinar su naturaleza debido a la calidad de imagen.

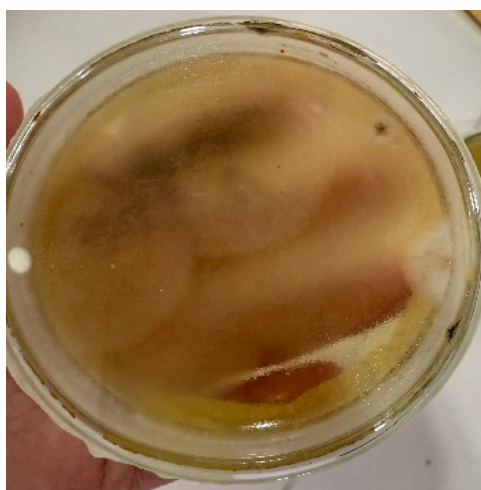


Imagen 32(SMA, 200g C) macroscópicas. Colonias pigmentadas

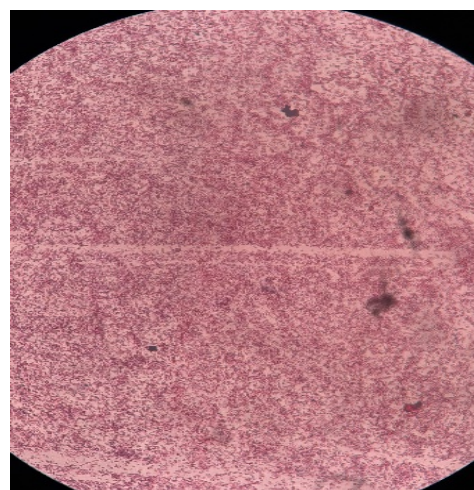


Imagen 33 (SMA, 200g C) microscópicas. Cocos indeterminados

En la **imagen 32**, se pueden notar colonias medianas, pigmentadas. Distribución uniforme. Sin embargo, en la muestra de colágeno concentración 200 gr se observan cocos, no es posible distinguir entre grampositivos o gramnegativos. Ver **imagen 33**.

A continuación, se presentan en las **imágenes 34 y 35**, bajo desarrollo bacteriano en muestras de colágeno (150 g), posiblemente por condiciones de cultivo o contaminación previa.

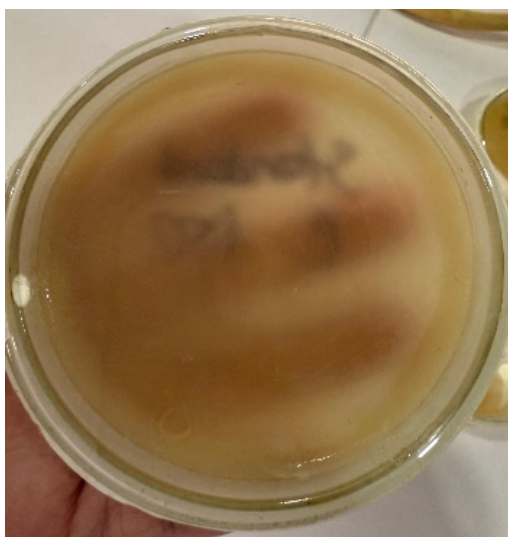


Imagen 34 (SMA, 150g C) macroscópicas. Colonias dispersas

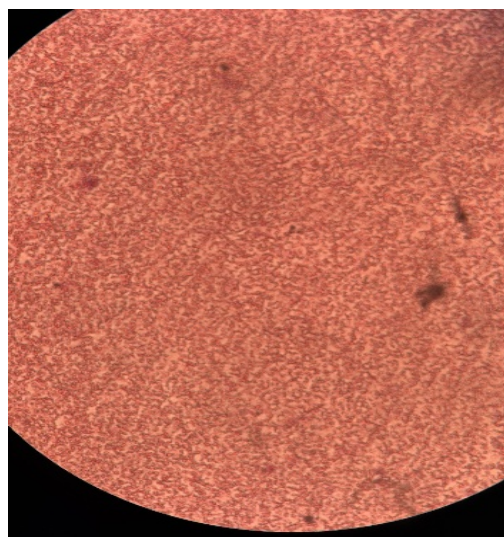


Imagen 35 (SMA, 150g C) microscópicas. Imagen difusa, sin estructuras claras

Cabe añadir que hay indicios de colonias dispersas, bajo crecimiento de colonias como se muestra en la **imagen 34** bacterianas. Por otra parte, en la muestra de colágeno de concentración 150 gr del medio SMA, no se logran observar estructuras microbianas compatibles, imagen difusa. Ver **imagen 35**.

Estas **imágenes 36 y 37** se ilustran la contaminación cruzada en cultivos de colágeno, donde se observan colonias bacterianas y una colonia fúngica destacada por su morfología filamentosa.

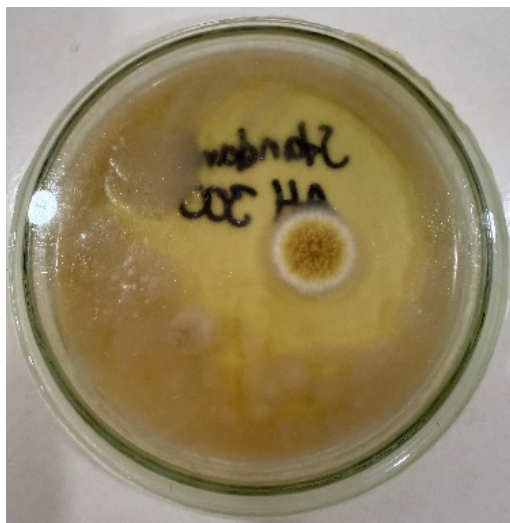


Imagen 36: (SMA, 300g AH) macroscópicas. Colonias traslúcidas con filamentos

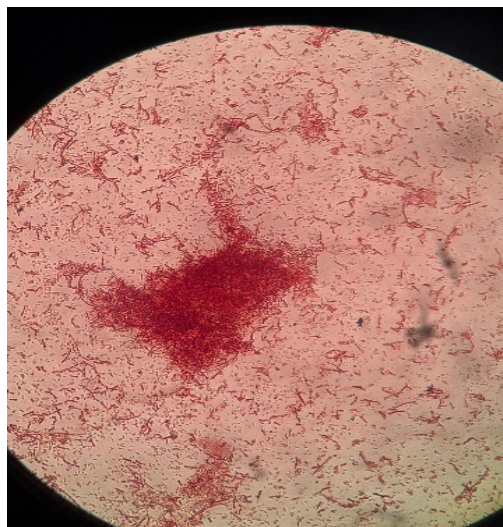


Imagen 37 (SMA, 300g AH) microscópicas. Presencia de cocobacilos Gram negativos

Hay crecimiento abundante de colonias cremosas de color traslucido, sin embargo, hay una colonia con borde irregular blanco, filamentososa y de color dorado, posiblemente contaminación por mohos ambientales. Ver **imagen 36**. Cómo podemos apreciar, en la **imagen 37**, se incide la presencia de cocobacilos gramnegativos.

Por último, en las **imágenes 38 y 39** se documenta un crecimiento tipo swarming en medios con colágeno (250 y 300 g), con distribución desorganizada y mezcla de morfologías bacterianas.

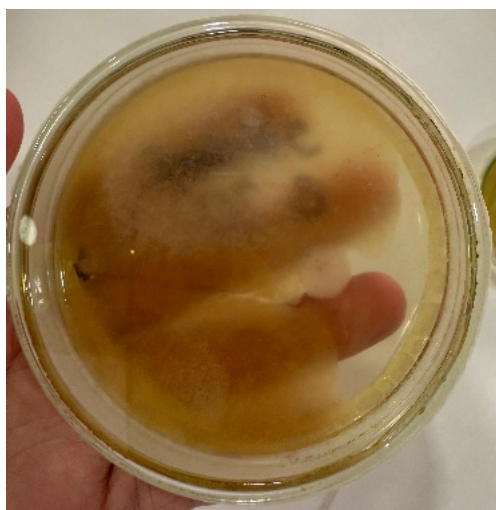


Imagen 38: (SMA, 250g C) macroscópicas. Swarming de colonias

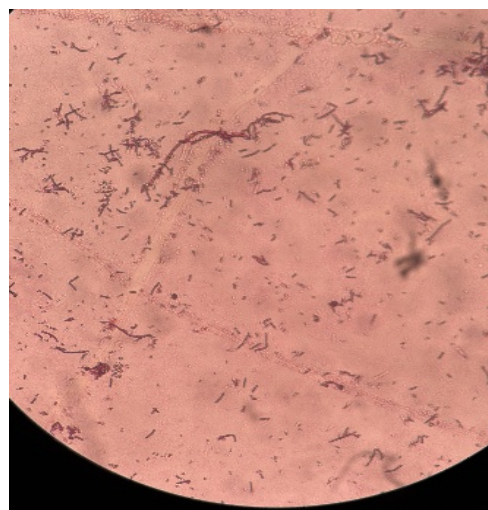


Imagen 39 (SMA, 250g C) microscópicas. Bacilos y cocos con morfología

En el mismo sentido, en **la imagen 38**, se aprecia crecimiento tipo *swarming* de colonias traslucidas cremosas y de tipo bacteriano, posible dispersión de condensación en la superficie del agar. Además, en la muestra de colágeno concentrada a 250 gr se obtuvieron resultados mixtos: bacilos y cocos. Morfología desorganizada. Ver **imagen 39**.

Las **imágenes 40 y 41**, se muestran un crecimiento limitado de bacterias, acompañado por una colonia fúngica en el borde de la caja, además de cocos Gram negativos definidos.

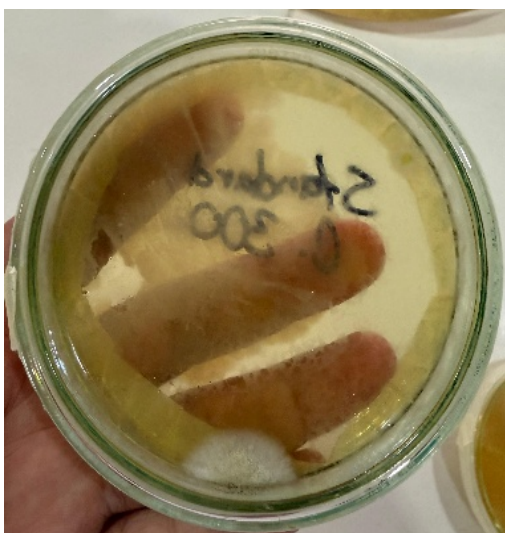


Imagen 40: (SMA, 300g C) macroscópicas. Colonias bacterianas bajas, moho en pared

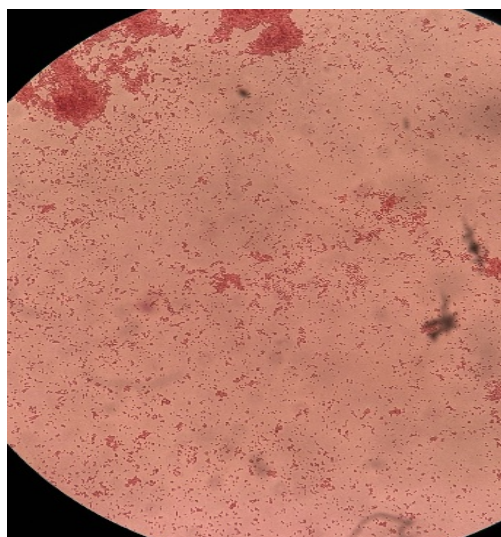


Imagen 41 (SMA, 300g C) microscópicas. Cocos Gram negativos bien definidos

Conjuntamente, en **la imagen 40** se aprecia crecimiento bajo de colonias bacterianas, se observa colonia filamentosa de borde irregular de color blanco en una pared de la caja, característico de contaminación por mohos ambientales. Por otro lado, en **la imagen 41** se observan cocos gramnegativos bien definidos, vistos en la muestra de colágeno de concentración 300 gr.

3.4 Análisis de resultados

En el **medio SGA**, diseñado para el crecimiento de hongos, se evidenció que las concentraciones de ácido hialurónico y colágeno a **250 g** favorecieron un crecimiento fúngico

intenso. Las colonias presentaron una apariencia densa, con micelio extenso y procesos activos de esporulación. Este comportamiento sugiere condiciones óptimas para el desarrollo de hongos filamentosos. Por otro lado, a **300 g** se observó un crecimiento tipo *swarming* que cubría toda la superficie del agar, lo que puede interpretarse como una respuesta a una sobrecarga de nutrientes o humedad, generando una propagación acelerada y desorganizada del micelio. En contraste, las muestras con concentraciones más bajas, especialmente a **150 g**, mostraron un crecimiento limitado o casi nulo, lo que indica que la cantidad de sustrato disponible no fue suficiente para promover un desarrollo fúngico adecuado.

En cuanto al **medio SMA**, utilizado para la observación de bacterias, también se registró un crecimiento más evidente en las concentraciones de **250 g**, donde se formaron colonias cremosas, con morfología variada, lo cual sugiere una alta carga bacteriana y diversidad de especies. Sin embargo, a **300 g**, aunque hubo presencia de bacterias, se observó un comportamiento irregular, probablemente debido a la aparición de hongos que podrían haber interferido o competido con las bacterias, generando una posible inhibición o contaminación cruzada. En las muestras a **150 g**, el crecimiento bacteriano fue escaso y, en algunos casos, inexistente, posiblemente por la baja disponibilidad de nutrientes esenciales para el desarrollo de estos microorganismos.

Desde el punto de vista **microscópico**, las muestras correspondientes a 250 g de ácido hialurónico y colágeno mostraron la mayor diversidad morfológica, con la presencia simultánea de **bacilos, cocos y estructuras fúngicas** como hifas y esporas, lo cual refuerza la idea de que esta concentración fue la más favorable para el crecimiento microbiano mixto. A **300 g**, las observaciones revelaron principalmente estructuras fúngicas dominantes, algunas con características propias de contaminación ambiental, como hifas gruesas o agrupamientos irregulares de esporas. Finalmente, las imágenes obtenidas a **150 g** fueron en su mayoría borrosas

o con escasa presencia microbiana, reflejando nuevamente una limitada actividad microbiológica, probablemente debido a la insuficiencia de nutrientes.

Se utilizó una escala semicuantitativa de crecimiento microbiano (1 a 5 ufc -*unidades formadoras de colonias*-) para evaluar las muestras. Como se muestra a continuación en la **tabla 9**.

Tabla 9 de resultados

Tratamiento	Concentración (g)	SMA (Bacterias UFC)	SGA (Hongos UFC)
AH	150	3	2
AH	200	4	4
AH	250	5	5
AH	300	1	1
C	150	3	2
C	200	4	4
C	250	5	5
C	300	1	1

El crecimiento microbiano aumenta con la concentración hasta 250g, y luego disminuye abruptamente a 300g.

Se identificó una **fuerte correlación positiva** entre crecimiento bacteriano y fúngico hasta 250g. A 300g, esta correlación se invierte, posiblemente por efectos inhibitorios (Frey-Klett et al., 2011).

Concentraciones de 250g favorecen el desarrollo microbiano, lo que sugiere que los

extractos actúan como **sustratos ricos en nutrientes**.

A **300g**, el crecimiento disminuye marcadamente. Esto puede estar asociado con:

- Cambios en la osmolaridad o pH del medio.
- Presencia de compuestos con **efecto antimicrobiano** residual en altas concentraciones.
- La similitud de comportamiento entre AH y C indica que el efecto no depende del tipo de compuesto, sino de su **concentración y carga orgánica residual**.
- Las concentraciones bajas (150g) pueden reflejar una mejor eficiencia en la extracción química o menor contaminación inicial.

3.5 Análisis de resultados por objetivos

3.5.1 Caracterizar preliminarmente la generación de residuos de cáscara de huevo en una muestra de panaderías y reposterías del municipio de Aguachica, Cesar.

Como parte del diagnóstico inicial, se identificó y seleccionó de forma intencionada una muestra de cuatro empresas del sector: Carmen Pastelería, Tortas Kelly, Panadería Santa Clara y Tortas y Más. A través de encuestas estructuradas, se recolectó información sobre el número de empleados, tiempo de funcionamiento, consumo semanal de huevos y manejo de residuos. Esta caracterización permitió estimar la generación potencial de residuos de cáscara de huevo, observándose que tres de las empresas corresponden al sector de repostería y una al de panadería. Durante una semana de recolección, se cuantificó un total de 11,049 kg de residuos, lo que evidencia un flujo constante de material orgánico disponible para procesos de aprovechamiento. Este insumo representa una alternativa sostenible para la obtención de biocompuestos como el colágeno y el ácido hialurónico.

3.5.2 Analizar métodos de extracción de colágeno y ácido hialurónico a partir de las

cáscaras y la membrana testácea del huevo

Se llevó a cabo una revisión bibliográfica rigurosa para identificar los métodos de extracción más reportados en la literatura científica, priorizando aquellos con respaldo experimental y viabilidad técnica. Entre los enfoques analizados se encontraron procesos químicos, enzimáticos y físicos. Particularmente, se evaluaron técnicas de hidrólisis ácida que permiten la desmineralización de la cáscara y la solubilización de proteínas de interés. En función de las condiciones del laboratorio y los recursos disponibles, se optó por un método químico basado en las propuestas de Benítez (2000), Cobeñas-Dueñas (2022) y Pérez-Gumeta et al. (2018), cuyas investigaciones demostraron la efectividad de la hidrólisis ácida controlada para extraer colágeno y ácido hialurónico en condiciones experimentales similares.

3.5.3 Evaluar la efectividad del método seleccionado para la extracción de ácido hialurónico y colágeno

Una vez seleccionado el método de extracción, se procedió a su aplicación experimental bajo condiciones controladas. El procedimiento consistió en la adición de ácido clorhídrico diluido (0.1–1%) para desmineralizar la cáscara, seguido de calentamiento a temperaturas entre 60–70 °C, neutralización con hidróxido de sodio y posterior separación del extracto. A pesar de que la cantidad de biomoléculas extraídas fue baja, se logró identificar la presencia de colágeno y ácido hialurónico en las muestras, lo cual valida la viabilidad del proceso. Para aumentar la concentración, fue necesario agrupar los lotes de tratamiento. La efectividad del método se interpretó a partir de la calidad del material obtenido y su potencial de aprovechamiento en estudios posteriores, evidenciando que, aunque el rendimiento fue limitado, el protocolo es aplicable en condiciones de laboratorio, como lo sustentan los estudios previamente mencionados.

A partir de las pruebas realizadas, se pudo evidenciar que el proceso químico empleado para la extracción de colágeno y ácido hialurónico a partir de cáscaras de huevo y su membrana testácea fue efectivo. La prueba de Biuret, utilizada para la detección de proteínas, arrojó resultados positivos en las muestras de 200 g, 250 g y 300 g, lo que confirma la presencia de colágeno en dichas concentraciones. Este hallazgo sugiere que el método aplicado permite liberar y conservar las estructuras proteicas características del colágeno.

Por otro lado, la prueba con azul de metileno, junto con el análisis físico-sensorial, permitió identificar la presencia de ácido hialurónico en las muestras analizadas. Las características visuales y sensoriales como la viscosidad y la formación de un gel tras la reacción con el colorante respaldan la efectividad del proceso químico en la extracción de esta sustancia.

En conjunto, los resultados obtenidos demuestran que el método químico propuesto no solo es viable, sino también eficiente para la recuperación simultánea de colágeno y ácido hialurónico desde residuos agroindustriales como la cáscara de huevo. Esta evidencia respalda la posibilidad de aprovechar un subproducto comúnmente descartado, aportando valor agregado y abriendo la puerta a futuras aplicaciones en las industrias cosmética, farmacéutica y alimentaria.

Las concentraciones de 250g representan un punto óptimo para crecimiento microbiano, mientras que a 300g se observa un posible efecto inhibitor potencial (Torres-Mansilla et al., 2023). Además, el tipo de extracto (AH o C) no influye significativamente en la cantidad de contaminación microbiana. Por otro lado, el crecimiento de hongos y bacterias muestra un patrón paralelo, confirmando que el extracto en polvo actúa como medio de cultivo si no es adecuadamente tratado. Ante este hallazgo, es urgente incorporar procesos de descontaminación post-extracción (irradiación UV, calor seco, filtración estéril o gamma) para garantizar inocuidad

microbiológica.

Asimismo, no se encontraron diferencias significativas entre el crecimiento observado en muestras de ácido hialurónico y colágeno a la misma concentración. Esto indica que, desde el punto de vista microbiológico, ambos extractos tienen una carga residual similar, probablemente debida al origen común (cáscara de huevo)(Rodríguez Hidalgo, 2024). y a la similitud en sus procesos de extracción.

4. CONCLUSIONES

El presente estudio tuvo como objetivo principal evaluar la viabilidad técnica de la extracción de colágeno y ácido hialurónico a partir de cáscaras de huevo y su membrana testácea en el municipio de Aguachica, Cesar. Para ello, se desarrollaron actividades orientadas a caracterizar la generación de residuos en panaderías y reposterías locales, analizar los métodos más adecuados para la extracción de estos biocompuestos, y aplicar experimentalmente una metodología seleccionada bajo condiciones de laboratorio. A continuación, se presentan las conclusiones obtenidas en función de los objetivos específicos planteados, destacando los principales hallazgos y su relevancia en el contexto del aprovechamiento de residuos agroindustriales.

Caracterizar preliminarmente la generación de residuos de cáscara de huevo en una muestra de panaderías y reposterías del municipio de Aguachica, Cesar.

La caracterización realizada en cuatro panaderías y reposterías de Aguachica, Cesar, permitió evidenciar una generación considerable de residuos de cáscara de huevo, con un total de 11,049 kg recolectados en una semana. Aunque el estudio se centró en una muestra limitada de establecimientos, los resultados reflejan el alto potencial de este sector como fuente sostenible de materia prima para la obtención de biocompuestos, abriendo oportunidades para su valorización dentro de un enfoque de economía circular.

Analizar métodos de extracción de colágeno y ácido hialurónico a partir de las cáscaras y la membrana testácea del huevo.

El análisis técnico y documental de los distintos métodos de extracción permitió identificar al método químico basado en hidrólisis ácida como una alternativa viable y adaptable para el aislamiento de colágeno y ácido hialurónico a partir de cáscaras y membranas de huevo. Esta técnica destaca por su simplicidad, aplicabilidad en condiciones de laboratorio y compatibilidad con recursos disponibles, lo que la convierte en una opción adecuada para proyectos de aprovechamiento de residuos en contextos académicos o de pequeña escala productiva. Además, su selección respondió a criterios de eficiencia, factibilidad operativa y coherencia con los principios de sostenibilidad.

Evaluar la efectividad del método seleccionado para la extracción de ácido hialurónico y colágeno. La aplicación experimental del método químico evidenció que, si bien el rendimiento de biomoléculas fue limitado, la presencia de colágeno y ácido hialurónico en las muestras confirma la viabilidad técnica del proceso bajo condiciones controladas. La necesidad de agrupar lotes para obtener concentraciones adecuadas sugiere que el método puede ser optimizado con ajustes en las condiciones operativas. Estos resultados demuestran que el protocolo seleccionado es aplicable en entornos de laboratorio y ofrece un punto de partida para estudios más avanzados de purificación, cuantificación y aplicación de los biocompuestos extraídos.

5. RECOMENDACIONES

Para optimizar el proceso de extracción y aumentar tanto el rendimiento como la pureza, se recomienda continuar con la experimentación en fases avanzadas, incluyendo estudios microbiológicos y toxicológicos del producto. Asimismo, es fundamental realizar estudios a mayor escala que permitan validar la viabilidad técnica y económica de la extracción en entornos industriales. Además, se debe promover la recolección organizada de cáscaras de huevo en panaderías y reposterías con el fin de evitar su disposición inadecuada en vertederos, e incentivar prácticas de economía circular en el municipio de Aguachica mediante alianzas estratégicas entre la academia, la industria alimentaria y las autoridades ambientales.

Por otro lado, para evidenciar la presencia de ácido hialurónico, es recomendable realizar tinción con Alcían Blue en lugar de azul de metileno; sin embargo, en este caso se utilizó este último reactivo por ser el que estaba al alcance, y además funcionó como colorante catiónico en compuestos aniónicos. Es importante implementar un sistema de extracción distinto al papel filtro que facilite la recolección del colágeno y el ácido hialurónico, dado que gran parte del compuesto se adhiere al papel durante el filtrado. También se deben implementar pasos de descontaminación para evitar riesgos microbiológicos en productos destinados a aplicaciones cosméticas, farmacéuticas o alimentarias. Igualmente, se debe incluir análisis microbiológicos en todas las etapas del proceso productivo, especialmente cuando se utilizan concentraciones elevadas. Finalmente, es clave evaluar el potencial antimicrobiano de los extractos a 300g para su posible uso como inhibidor biológico, y mejorar las condiciones de extracción para minimizar residuos orgánicos y humedad que favorezcan la proliferación microbiana.

6. BIBLIOGRAFIA

Clinica Universidad de Navarra. (2023). Obtenido de <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/acido-hialuronico#:~:text=%C2%BFQu%C3%A9%20es%20el%20%C3%A1cido%20hialur%C3%B3nico,%C3%A1cido%20glucur%C3%B3nico%20y%20N%2Dacetilglucosamina>.

Comisión Europea. (2024). Obtenido de CORDIS - Resultados de investigaciones de la UE: <https://cordis.europa.eu/article/id/93064-a-little-extra-value-fromeggshells/es>

lafarmacia.es. (2018). Obtenido de <https://www.lafarmacia.es/farmacia/el-mejor-colageno-importa-su-origen>

Paula Oulego, Amanda Laca, Sonia Calvo, Mario Díaz. (s.f.). *Universidad de Oviedo.* Obtenido de <https://www.institutohuevo.com/wp-content/uploads/2020/10/TRABAJO-Premio-IEH-2020.pdf>

Telencuesta. (s.f.). Obtenido de <https://telencuestas.com/censos-de-poblacion/colombia/2024/cesar/aguachica>

stro, M. (24 de 02 de 2021). *Instituto de estudios del huevo.* Obtenido de Instituto de estudios del huevo: <https://www.institutohuevo.com/la-membrana-de-la-cascara-del-huevo-nuevo-ingrediente-funcional/>

Catalá, G.P. (2023). *Instituto de estudios del huevo.* Obtenido de https://www.institutohuevo.com/estructura_huevo/

Batista, M. P., Fernández, N., Gaspar, F. B., Bronze, M. do R., & Duarte, A. R. C. (2022). Extraction of Biocompatible Collagen From Blue Shark Skins Through the Conventional Extraction Process Intensification Using Natural Deep Eutectic Solvents. *Frontiers in Chemistry, 10*. <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.937036>

Coca, A. A. & R. A. (2023). *UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO FACULTAD DE*

CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS.

Farooq, S., Ahmad, M. I., Zheng, S., Ali, U., Li, Y., Shixiu, C., & Zhang, H. (2024). A review on marine collagen: sources, extraction methods, colloids properties, and food applications. In *Collagen and leather* (Vol. 6, Issue 1). Springer. <https://doi.org/10.1186/s42825-024-00152-y>

Fernandez, C. B. (2021). *FACULTAD DE ODONTOLOGÍA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.*

Huang, C. Y., Kuo, J. M., Wu, S. J., & Tsai, H. T. (2016). Isolation and characterization of fish scale collagen from tilapia (*Oreochromis sp.*) by a novel extrusion-hydro-extraction process. *Food Chemistry*, *190*, 997–1006. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.066>

Khong, N. M. H., Yusoff, F. M., Jamilah, B., Basri, M., Maznah, I., Chan, K. W., Armania, N., & Nishikawa, J. (2018). Improved collagen extraction from jellyfish (*Acromitus hardenbergi*) with increased physical-induced solubilization processes. *Food Chemistry*, *251*, 41–50. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.12.083>

Liang, Q., Wang, L., Sun, W., Wang, Z., Xu, J., & Ma, H. (2014). Isolation and characterization of collagen from the cartilage of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). *Process Biochemistry*, *49*(2), 318–323. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2013.12.003>

Machado, A. (2024). *FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD CARRERA DE CIRUGÍA DENTAL.*

Nuerjiang, M., Bai, X., Sun, L., Wang, Q., Xia, X., & Li, F. (2023). Size effect of fish gelatin nanoparticles on the mechanical properties of collagen film based on its hierarchical structure. *Food Hydrocolloids*, *144*, 108931. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2023.108931>

Pérez, J. H. (2016). *TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO INFORME TÉCNICO DE RESIDENCIA PROFESIONAL Empresa: INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA*

GUTIÉRREZ Presenta: Asesora.

Sánchez, E. (2020). "DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA OBTENCIÓN DE HIDROGELES DE COLÁGENO I/ÁCIDO HIALURÓNICO CON HEPATOCITOS DERIVADOS DE iPSCs COMO MODELO 3D PARA EL ENSAYO DE MEDICAMENTOS HEPATOTÓXICOS" TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL (ETSIAMN).

Sousa, R. O., Martins, E., Carvalho, D. N., Alves, A. L., Oliveira, C., Duarte, A. R. C., Silva, T. H., & Reis, R. L. (2020). Collagen from Atlantic cod (*Gadus morhua*) skins extracted using CO₂ acidified water with potential application in healthcare. *Journal of Polymer Research*, 27(3). <https://doi.org/10.1007/s10965-020-02048-x>

Velez Miñano, L. Y., & Fernandez Baca, J. C. (2024). Técnicas de extracción de colágeno: Aplicaciones y tendencias científicas. *Manglar*, 21(3), 391–399. <https://doi.org/10.57188/manglar.2024.043>

Agustin, E. W., Tassabila, D. E. C., Nisa, Z. A., Rizqi, I. K., Safitri, E. N., & Sulistiyowati, M. I. (2022). Collagen face spray: Facial moisturizer from chicken egg shell membrane to prevent premature aging. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 969(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/969/1/012008>

Arnold, J., & Rupert, D. (2008). *Data Validation Report Yellowstone National Park Water Quality Monitoring Greater Yellowstone Inventory and Monitoring Network*.

Batista, M. P., Fernández, N., Gaspar, F. B., Bronze, M. do R., & Duarte, A. R. C. (2022). Extraction of Biocompatible Collagen From Blue Shark Skins Through the Conventional Extraction Process Intensification Using Natural Deep Eutectic Solvents. *Frontiers in Chemistry*, 10. <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.937036>

Bedoya-Salazar, A., & Valencia-González, M. P. (2020). Usos potenciales de la cáscara de huevo de gallina (*Gallus gallus domesticus*): una revisión sistemática. *Revista Colombiana de Ciencia Animal - RECIA*, 12(2), e776. <https://doi.org/10.24188/recia.v12.n2.2020.776/>

Beltrán Ramírez, N. , G. F. Y. , & H. G. L. J. (2021). UNIVERSIDAD EAN ESTUDIO PARA EL DESARROLLO DE UN BIOMATERIAL DE CÁSCARA DE HUEVO AUTORES NATHALIA BELTRÁN RAMÍREZ, INGENIERÍA QUÍMICA. YENNY GONZÁLEZ FINO, INGENIERÍA QUÍMICA LADY JOHANNA HERNÁNDEZ GÓMEZ, INGENIERÍA QUÍMICA. PROFESORA LILIANA MARGARITA MEZA BUELVAS FACULTAD DE INGENIERÍA BOGOTÁ, 2021.

- Benitez, G. S. M. D. M. (2000). *UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2000 Disolución de la cáscara de huevo de gallina en HCl.*
- Bibiana, Á., Y. P., Y. R., & M. Á. (2023). *1 ECONOMIA CIRCULAR EN EL USO DE LAS CÁSCARAS DE HUEVO COMO BIORRESIDUO.*
- Cabrera-Estrada, I., & Alejandro Iglesias-Barreto, G. (2024). *Evaluación del secado de cáscaras de huevo a escala de laboratorio para su aprovechamiento industrial Evaluation of eggshell drying on a laboratory scale for industrial use.* 44(2). <https://orcid.org/0000-0002-9344-2304>
- Cao, C., Wang, H., Zhang, J., Kan, H., Liu, Y., Guo, L., Tong, H., Wu, Y., & Ge, C. (2023). Effects of Extraction Methods on the Characteristics, Physicochemical Properties and Sensory Quality of Collagen from Spent-Hens Bones. *Foods*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/foods12010202>
- cappuccino - microbiology - a laboratory manual - 11ed - 2017.* (n.d.).
- Carolina, I. J., & Gaona, S. (2011). *Estandarización de un proceso de extracción de colágeno a partir de los residuos de fileteo de tilapia (Oreochromis sp) y cachama (Piaractus brachypomus).*
- Chávez Feijoó, S. A. (2021). *UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ Colegio de Ciencias e Ingeniería.*
- Cobeñas-Dueñas, M. V., D.-R. A. A., D.-D. M. H., & R.-D. J. M. (2022). *revista SCIELO.pdf.*
- Coca, A. A. & R. A. (2023). *UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS.*
- Cowman, M. K., Schmidt, T. A., Raghavan, P., & Stecco, A. (2015). Viscoelastic Properties of Hyaluronan in Physiological Conditions. In *F1000Research* (Vol. 4). F1000 Research Ltd. <https://doi.org/10.12688/f1000research.6885.1>
- Eyre DR, K. P., & Al, C. (1978). Hyaluronic Acid and Replacement of Vitreous and Aqueous Humor Mod. In *Physiological Reviews* (Vol. 58, Issue 1).
- Farooq, S., Ahmad, M. I., Zheng, S., Ali, U., Li, Y., Shixiu, C., & Zhang, H. (2024). A review on marine collagen: sources, extraction methods, colloids properties, and food applications. In *Collagen and leather* (Vol. 6, Issue 1). Springer. <https://doi.org/10.1186/s42825-024-00152-y>
- FENAVI. (2022). *Caracterización económica del sector avícola en el departamento de Cesar.*
- Fernandez, C. B. (2021). *FACULTAD DE ODONTOLOGÍA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.*
- Frey-Klett, P., Burlinson, P., Deveau, A., Barret, M., Tarkka, M., & Sarniguet, A. (2011). Bacterial-Fungal Interactions: Hyphens between Agricultural, Clinical, Environmental, and Food Microbiologists. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(4), 583–609. <https://doi.org/10.1128/mubr.00020-11>
- Gamazo Herrero, C. (2022). *Revisión de la eficacia de los suplementos de colágeno y ácido hialurónico en la salud de la piel y el aparato locomotor.* <https://uvadoc.uva.es/handle/10324/54096>
- Glòria Bernal^{1, 2}, Rosa M^a Solà^{1,2}, Maria C. Casajuana^{1,2}, Laura Pérez-Merino^{1,2}, Jenny Fabal^{1,2}, Roser González^{1,2}, Ana E. Astilleros^{1,2}, Montserrat Giralt². (2018). *Efecto del extracto de cresta de gallo, rico en ácido hialurónico, sobre los parámetros isocinéticos en personas con gonalgia leve.*
- Hu, S., Bai, X. D., Liu, X. Q., Wang, H. Bin, Zhong, Y. X., Fang, T., & Zhou, F. Q. (2013). Pyruvate Ringer's Solution Corrects Lactic Acidosis and Prolongs Survival during Hemorrhagic Shock in Rats. *The Journal of Emergency Medicine*, 45(6), 885–893.

- <https://doi.org/10.1016/J.JEMERMED.2013.04.062>
- Huang, C. Y., Kuo, J. M., Wu, S. J., & Tsai, H. T. (2016). Isolation and characterization of fish scale collagen from tilapia (*Oreochromis sp.*) by a novel extrusion-hydro-extraction process. *Food Chemistry*, *190*, 997–1006. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.066>
- Kheirabadi, E. R. S. K. F. G. M. (2018). Optimizing the extraction of acid-soluble collagen inside the eggshell membrane. *Food Science and Technology Research*, *24*(3), 385–394. <https://doi.org/10.3136/fstr.24.385>
- Khong, N. M. H., Yusoff, F. M., Jamilah, B., Basri, M., Maznah, I., Chan, K. W., Armania, N., & Nishikawa, J. (2018). Improved collagen extraction from jellyfish (*Acromitus hardenbergi*) with increased physical-induced solubilization processes. *Food Chemistry*, *251*, 41–50. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.12.083>
- Kulshreshtha, G., Diep, T., Hudson, H. A., & Hincke, M. T. (2022). High value applications and current commercial market for eggshell membranes and derived bioactives. *Food Chemistry*, *382*, 132270. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.132270>
- Laurent, T. C., & Fraser, J. R. E. (1992). Hyaluronan ¹. *The FASEB Journal*, *6*(7), 2397–2404. <https://doi.org/10.1096/fasebj.6.7.1563592>
- Layne, E. (1957). [73] Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods in Enzymology*, *3*(C), 447–454. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(57\)03413-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(57)03413-8)
- Liang, Q., Wang, L., Sun, W., Wang, Z., Xu, J., & Ma, H. (2014). Isolation and characterization of collagen from the cartilage of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). *Process Biochemistry*, *49*(2), 318–323. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2013.12.003>
- Limroongreungrat, K., Sangnark, A., & Ponkham, W. (2011). *Extraction of collagen from hen eggshell membrane by using organic acids*. <https://www.researchgate.net/publication/279554768>
- Machado, A. (2024). *FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD CARRERA DE CIRUGÍA DENTAL*.
- Mary Jo Zimbro, E., David Power, M. A., Miller, S. M., George Wilson, M. E., & Julie Johnson, M. A. (2013). *Difco □ & BBL □ Manual Manual of Microbiological Culture Media Second Edition*.
- Mensah, R. A., Salim, K., Peszko, K., Diop, S., Wong, T. H., & Chau, D. Y. (2023). The chicken eggshell membrane: a versatile, sustainable, biological material for translational biomedical applications. In *Biomedical Materials (Bristol)* (Vol. 18, Issue 4). Institute of Physics. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/acd316>
- Nuerjiang, M., Bai, X., Sun, L., Wang, Q., Xia, X., & Li, F. (2023). Size effect of fish gelatin nanoparticles on the mechanical properties of collagen film based on its hierarchical structure. *Food Hydrocolloids*, *144*, 108931. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2023.108931>
- Pearse, A. G. E. (Anthony G. E. (1980). *Histoquímica, teórica y aplicada: Vol. Vol. 2* (Edimburgo; Nueva York :Churchill Livingstone ; Nueva York : Distribuido por Longman, Ed.; fourth edition). Churchill Livingstone.
- Pérez, J. H. (2016). *TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO INFORME TÉCNICO DE RESIDENCIA PROFESIONAL Empresa: INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ Presenta: Asesora*.
- Pérez-Gumeta, B. D. , M.-G. R. , V.-C. L. M. C. , E.-S. S. , A.-A. M. , V.-M. J. J. , C.-R. R. I. , A.-T. T. R. (2018). *OPTIMIZACION DEL METODO DE EXTRACCION DE ACIDO HIALURONICO DEL HUMOR VITREO DE Oreochromis niloticus*.
- Pizarro, S. M. (2020). Egg shell membrane applied to wounds. In *Revista Cubana de Medicina*

- Militar* (Vol. 49, Issue 4).
<http://scielo.sld.cu><http://www.revmedmilitar.sld.cu>BajolicenciaCreativeCommons
- Polastri, R., Director, R., & Ruiz, J. D. (2024). *Technical questions*. www.ifad.org
- Quintero, J., & Zapata, J. E. (2017). Optimización de la Extracción del Colágeno Soluble en Ácido de Subproductos de Tilapia Roja (*Oreochromis spp*) mediante un Diseño de Superficie de Respuesta. *Informacion Tecnologica*, 28(1), 109–120.
<https://doi.org/10.4067/S0718-07642017000100011>
- Ricardo, A., & Vergara, P. (2020). *Proyecto para optar al título de Diseñador Industrial*.
- Rodríguez Hidalgo, M. A. M. V. S. A. P. C. S. (2024). *Determinación del contenido de Ácido Hialurónico en la membrana intersticial de las cáscaras de huevo generadas como residuos en la Industria Panificadora*.
- Sánchez, E. (2020). “DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA OBTENCIÓN DE HIDROGELES DE COLÁGENO I/ÁCIDO HIALURÓNICO CON HEPATOCITOS DERIVADOS DE iPSCs COMO MODELO 3D PARA EL ENSAYO DE MEDICAMENTOS HEPATOTÓXICOS” TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL (ETSIAMN).
- Sinha, S., Aman, A. K., Singh, R. K., Kr, N., & Shivani, K. (2020). Calcium oxide(CaO) nanomaterial (Kukutanda twak Bhasma) from egg shell: Green synthesis, physical properties and antimicrobial behaviour. *Materials Today: Proceedings*, 43, 3414–3419.
<https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.09.072>
- Sousa, R. O., Martins, E., Carvalho, D. N., Alves, A. L., Oliveira, C., Duarte, A. R. C., Silva, T. H., & Reis, R. L. (2020). Collagen from Atlantic cod (*Gadus morhua*) skins extracted using CO2 acidified water with potential application in healthcare. *Journal of Polymer Research*, 27(3). <https://doi.org/10.1007/s10965-020-02048-x>
- Thuanthong, M., Sirinupong, N., & Youravong, W. (2016). Triple helical structure of acid-soluble collagen derived from Nile tilapia skin as affected by extraction temperature. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(11), 3795–3800.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.7572>
- Torres-Mansilla, A., Hincke, M., Voltes, A., López-Ruiz, E., Baldión, P. A., Marchal, J. A., Álvarez-Lloret, P., & Gómez-Morales, J. (2023). Eggshell Membrane as a Biomaterial for Bone Regeneration. In *Polymers* (Vol. 15, Issue 6). MDPI.
<https://doi.org/10.3390/polym15061342>
- Tsao, F. (2012). *ES2383003T3*.
- Velez Miñano, L. Y., & Fernandez Baca, J. C. (2024). Técnicas de extracción de colágeno: Aplicaciones y tendencias científicas. *Manglar*, 21(3), 391–399.
<https://doi.org/10.57188/manglar.2024.043>

7. ANEXOS

Anexo 1. Encuesta aplicada a panaderías y reposterías del municipio de Aguachica, Cesar

A continuación, se presenta una imagen del formato de encuesta utilizada para recolectar información sobre la generación de residuos de cáscara de huevo. Este instrumento fue aplicado a las empresas seleccionadas con el fin de caracterizar su consumo de huevos y manejo de

ENCUESTA SOBRE EL USO DE LAS CÁSCARAS DE HUEVO EN REPOSTERÍAS Y PANADERÍAS

Objetivo: evaluar la recolección y el aprovechamiento de cáscaras de huevo en el municipio de Aguachica, con el fin de proponer soluciones sostenibles para el manejo de residuos. Esta encuesta hace parte de una investigación para el desarrollo de Tesis que llevan a cabo estudiantes del programa de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Popular del Cesar.

- **Tratamiento de Datos Personales:** En cumplimiento de la Ley 1581 de 2012, los datos personales serán confidenciales y usados solo para esta investigación. Los participantes pueden solicitar actualización o eliminación de sus datos, que no serán compartidos sin su autorización. Al completar la encuesta, el participante acepta el uso de sus datos según la ley.

1. Información General del establecimiento

1.1. Nombre del establecimiento:

1.2. Ubicación:

Ciudad: _____

Barrio o zona: _____

1.3. Tipo de negocio:

- 1. Panadería
- 2. Repostería
- 3. Ambos

1.4. Número de empleados

- 1. Menos de 5
- 2. 5-10
- 3. Mas de 10

1.5. Tiempo de funcionamiento:

- 1. Menos de 1 año
- 2. 1-5 años
- 3. Más de 5 años

2. Consumo de huevos en el establecimiento:

2.1. ¿Cuántos huevos utiliza en promedio al día?

- 1. Menos de 100
- 2. 100-200
- 3. Más de 200

2.2. ¿Cómo gestiona actualmente las cáscaras de huevo?

- 1. Se desechan con otros residuos orgánicos
- 2. Se separan
- 3. Se reutilizan internamente
- 4. Otro: _____

2.3. ¿Estaría dispuesto a colaborar con un programa de recolección de cáscaras de huevo para proyectos de investigación y sostenibilidad?

- 1. Sí
- 2. No

3. Manejo de residuos y prácticas sostenibles:

3.1. ¿Está implementando actualmente prácticas de manejo sostenible de residuos en su establecimiento?

- 1. Sí
- 2. No

3.2. En caso afirmativo, ¿cuáles de las siguientes prácticas realiza? (Marque todas las que apliquen)

- 1. Separación de residuos orgánicos e inorgánicos
- 2. Reciclaje de envases y empaques
- 3. Compostaje
- 4. Otro: _____

3.3. ¿Cómo maneja específicamente los desechos de las cáscaras de huevo?

- 1. Se colocan en bolsas de basura comunes
- 2. Se separan de otros residuos orgánicos
- 3. Se trituran antes de desechar
- 4. Se almacenan temporalmente antes de ser desechado
- 5. Otro (especificar): _____

4. Recolección de cáscaras de huevo para investigación:

4.1. ¿Estaría dispuesto a participar en una red de recolección periódica de cáscaras de huevo para proyectos de investigación y desarrollo sostenible?

- 1. Sí
- 2. No

desechos orgánicos.

Observación: En el desarrollo y presentación del Anteproyecto (Formato No.2), deben aplicar las normas ICONTEC). Se debe hacer entrega de un original y dos copias del anteproyecto impreso, y una copia magnética a la Coordinación de Proyectos. Anexar oficio de entrega con el V.B. del director y asesor metodológico.