



Universidad  
**Mariana**

Determinación del contenido de Ácido Hialurónico en la membrana intersticial de las cáscaras de huevo generadas como residuos en la Industria Panificadora

María Alejandra Rodríguez Hidalgo  
Sebastián Alejandro Moreno Valencia  
Santiago Patichoy Calpa

Universidad Mariana  
Facultad De Ingeniería  
Ingeniería De Procesos  
San Juan de Pasto

2024

Determinación del contenido de Ácido Hialurónico en la membrana intersticial de las cáscaras de huevo generadas como residuos en la Industria Panificadora

María Alejandra Rodríguez Hidalgo  
Sebastián Alejandro Moreno Valencia  
Santiago Patichoy Calpa

Asesor: MSc. Hugo Andrés Gomajoa Enríquez

Universidad Mariana  
Facultad De Ingeniería  
Ingeniería De Procesos  
San Juan de Pasto

2024

Artículo 71: los conceptos, afirmaciones y opiniones emitidos en el Trabajo de Grado son responsabilidad única y exclusiva del (los) Educando (s)

Reglamento de Investigaciones y Publicaciones, 2007

Universidad Mariana

## Contenido

Introducción .....	11
1. Resumen.....	13
1.1. Descripción del problema.....	14
1.1.1. Formulación del problema .....	15
1.2. Justificación.....	15
1.3. Objetivos .....	17
1.3.1. Objetivo general .....	17
1.3.2. Objetivos específicos.....	17
1.4. Marco referencial o fundamentos teórico.....	17
1.4.1. Antecedentes .....	17
1.4.2. Marco teórico .....	21
1.5. Metodología .....	23
1.5.1. Metodología para cumplir primer objetivo específico .....	24
1.5.2. Metodología para cumplir segundo objetivo específico .....	27
1.5.3. Metodología para cumplir tercer objetivo específico.....	29
1.5.4. Metodología para cumplir cuarto objetivo específico.....	29
2. Presentación y discusión de resultados .....	33
2.1. Cumplimiento del primer objetivo .....	33
2.1.1. Definición de metodología de separación de MCH .....	33
2.1.2. Separación MCH.....	34
2.1.3. Caracterización fisicoquímica.....	36
2.2. Cumplimiento del segundo objetivo .....	38
2.2.1. Digestión enzimática .....	38
2.3. Cumplimiento del tercer objetivo.....	47
2.3.1. Caracterización fisicoquímica del AH extraído de la MCH .....	47
2.3.2. Análisis cromatográfico HPLC .....	48
2.4. Cumplimiento del cuarto objetivo.....	49
2.4.1. Formulación de sérum.....	49
2.4.2. Análisis estadístico de diseño de mezclas .....	50
2.4.3. Análisis de resultados (NTC 4833, 2012) .....	53
3. Conclusiones .....	55

4. Recomendaciones .....	57
Referencias .....	58
Anexos.....	68

### **Índice de Tablas**

Tabla 1 Especificaciones para la cuantificación del AH en el cromatógrafo HPLC .....	29
Tabla 2 Diseño base de las corridas para el Sérum .....	30
Tabla 3 Diagrama de decisión de los métodos de separación de MCH. ....	33
Tabla 4 Caracterización fisicoquímica de la MCH .....	37
Tabla 5 Datos de DE en Python .....	40
Tabla 6 Datos del diseño experimental del AH.....	40
Tabla 7 ANOVA por TUKEY .....	41
Tabla 8 Efecto de las cantidades de enzima en el contenido de ácido hialurónico .....	44
Tabla 9 Tabla de caracterización fisicoquímica del extracto de AH.....	47
Tabla 10 Resultados de cromatografía líquida de muestra de AH .....	48
Tabla 11 Datos del diseño de mezclas .....	49
Tabla 12 ANOVA para diseño de mezclas. ....	51
Tabla 13 Composición sérum cosmético basado en NTC 4833, 2012.....	54

### **Índice de Figuras**

Figura 1 Metodología objetivo 1: Caracterización fisicoquímica de la MCH. ....	23
Figura 2 Metodología objetivo 2: Establecimiento de las condiciones para la obtención y cuantificación del AH.....	24
Figura 3 Metodología objetivo 3: Caracterización fisicoquímica del AH. ....	24
Figura 4 Metodología objetivo 4: Formulación de un sérum facial. ....	24
Figura 5 Separación de MCH por diferencia de densidades .....	35
Figura 6 MCH en secador de bandejas a 30°C.....	36
Figura 7 MCH una vez culminado el secado .....	36
Figura 8 Matriz de correlación de parámetros del DE .....	42

**Índice de Graficas**

Grafica 1 Gráfica de probabilidad de los valores de AH .....	38
Grafica 2 Prueba de igualdad de varianzas. ....	39
Grafica 3 Ajuste de medias de AH por Papaína.....	45
Grafica 4 Superficie de respuesta para cantidad de AH.....	46
Grafica 5 Grafica de contorno de mezcla.....	52
Grafica 6 Gráfica de rastreo de respuesta.....	53

**Índice de Ecuaciones**

Ecuación 1 Cálculo de capacidad antioxidante .....	32
Ecuación 2 Modelo matemático de ajuste para AH .....	45

**Índice de Anexos**

Anexos 1 Cronograma del proyecto .....	68
Anexos 2 Presupuesto del proyecto .....	69
Anexos 3 Código de programación Python.....	69
Anexos 4 Cromatogramas HPLC .....	72
Anexos 5 Cromatogramas muestras N°2-27 .....	72

## **Introducción**

El ácido hialurónico (AH) es un glucosaminoglicano de peso molar 1,5 - 2,0 g/mol, el cual se encuentra en los tejidos del cuerpo humano (Macías Ortega et al., 2015), es un componente con diversas aplicaciones cosméticas, buscando mejorar la hidratación y elasticidad del tejido cutáneo en productos comerciales como: cremas, geles, emulsiones y sérum. La aplicación de este tipo de productos permite la formación de una película viscosa que impide la absorción de sustancias extrañas del tejido cutáneo, al mismo tiempo que preserva su humedad.

El AH a diferencia de otros polisacáridos tiene una mejor cotización en la industria cosmética, por esta razón, el mercado mundial de este componente redondea los USD 500 millones por año, con un valor aproximado de USD 100/Kg AH (Chávez Feijoó, 2021).

El sector cosmético, juega un papel fundamental en la economía colombiana, teniendo un crecimiento significativo desde el año 2000, posicionando a Colombia como el segundo país con mayor biodiversidad, La relevancia que han adquirido los compuestos activos desde el año 2009, hicieron posible el ingreso al Programa de Transformación Productiva (PTP) del Ministerio de Comercio, Industria y Turismo, que tuvo como objetivo transformarla en una industria globalmente competitiva. La inversión en este sector ha sido representativa, presentando en los 3 últimos años una inversión cercana a los USD \$300 millones, buscando un fortalecimiento en temas de producción, innovación, distribución, etc. (Propaís, 2014).

Por otra parte, se destaca que uno de los productos residuales más importantes que genera la industria de los ovoproductos es la cáscara de huevo de gallina (CH), la cual va adherida a la membrana intersticial de cáscara de huevo (MCH). Adicionalmente, se ha identificado una problemática con la disposición de este residuo; ya que es un material que llega a los vertederos afectando de manera negativa el medio ambiente.

De acuerdo con lo anterior, el objetivo principal de esta investigación es determinar el contenido de AH presente en la MCH, e indagar acerca de posibles aplicaciones, para así obtener un beneficio social, económico y ambiental a partir de este potencial residuo, buscando reducir de cierta manera la carga en el relleno sanitario y la contaminación ambiental que esta conlleva, así como el impacto negativo que puede ejercer sobre la población (Campos, 2015).

## **1. Resumen**

El AH es un polisacárido glucosaminoglicano, el cual es un componente de uso potencial en la industria cosmética, extraído principalmente de tejidos animales a través de complejos y robustos procesos. En esta investigación, el AH fue obtenido y caracterizado mediante procesos fisicoquímicos, a partir de la MCH generada como residuo. El AH fue separado por medio de una digestión enzimática con papaína a una temperatura constante 60°C, y las variables de estudio fueron el tiempo, 8, 16 y 24 horas, y la relación de papaína 10, 20 y 30 mg/g MCH respectivamente. Se realizó una determinación cuantitativa de AH por cromatografía líquida HPLC donde se determinó que el factor tiempo no es estadísticamente significativo en la separación de AH, mientras que la relación de papaína tiene una alta correlación en el rendimiento de AH. Mientras tanto, el rendimiento más alto de AH,  $14,58 \pm 0,18$  mg/L, se obtuvo de las muestras incubadas a 24 horas, con una concentración de papaína 20 mg: g MCH y que decrece en una mayor concentración de enzima. Por último, se realizó un diseño de mezclas en la formulación de un sérum facial de AH, con el fin de encontrar la formulación adecuada para obtener el mayor porcentaje de capacidad antioxidante, el cual, por método DPPH, se obtuvo un resultado del 78,00%, el cual se presenta en la formulación con 4,00 % de AH, 70,00 % de agua destilada, 21,00 % de glicerina y 5,00% de ácido ascórbico.

## **1.1. Descripción del problema**

Anualmente a nivel mundial se generan 7 millones de toneladas de residuos de CH (Posso Vergara, 2020). En Colombia durante el año 2021 se produjeron 17.028 millones de huevos (FENAVI, 2022), con un consumo per cápita de 334 unidades. El departamento de Nariño cuenta con una población de 1.511.556 habitantes mayores de 4 años (DANE, 2023), teniendo en cuenta el consumo per cápita del huevo, se traduce un consumo en este año de 504.8 millones de huevos.

En los hogares y la industria alimentaria, la CH y la MCH se desechan como residuos, lo que corresponde aproximadamente el 10% del peso total del huevo (Alparce et al., 2018a), traduciendo cerca de 3.029 toneladas de CH y MCH, constituyendo una carga en el relleno sanitario y aumentando la generación de metano, alterando la flora y fauna al no estar en los lugares de depósito apropiados y desaprovechando este residuo potencial.

La CH de gallina tiene una composición 95,00 % de minerales, entre un 3,00 % a 3,50 % de componentes orgánicos, proteoglicanos y proteínas entre las que se pueden encontrar: ovotransferrina, ovocalixina y lisozima. En su parte interna cuenta con un film de queratina rica en colágeno, la cual se conoce como membrana, la cual en su mayoría se encuentra conformada por proteínas que aportan propiedades como la retención de agua y mejora estructural cutánea, que a su misma vez son bastante apetecidas en la industria cosmética en la formulación de productos cutáneos

Mencionado lo anterior, es necesario buscar alternativas al tratamiento de residuos de la industria alimentaria, muchos de estos subproductos son fuentes potenciales de productos con alto valor funcional, para lo cual, se propone encontrar procesos adecuados de reutilización y revalorización (Campos, 2015a). Adicionalmente, se puede destacar que los residuos de CH son de gran importancia debido a su alto contenido de proteínas y minerales (Chávez Feijoó, 2021a).

El AH y el colágeno son proteínas naturales que están presentes internamente en el cuerpo humano y sus tejidos. Cerca del 80,00 % del tejido cutáneo está compuesta de colágeno y una gran parte de AH que posee el cuerpo humano se encuentra concentrado en la piel. No obstante, la cantidad de estas proteínas presentes en el cuerpo humano se reduce con la edad, lo que conlleva a los signos de envejecimiento cutáneo, ya sea en forma de arrugas o líneas de expresión, siendo necesario compensar su cantidad mediante la aplicación física de cosméticos, con compuestos de origen natural (Manturova et al., 2018).

Existen muchas empresas que se dirigen a un mercado donde se reconocen el origen natural de los productos (Khanmohammadi et al., 2014). Por lo tanto, esta investigación aprovechará los residuos de CH de la industria panificadora en el departamento de Nariño para la obtención de AH, donde se cuenta con cerca de 1.600 panaderías, generando un residuo de producción promedio de 16,2 kg de CH semanales por establecimiento, lo que traduce cerca de 80,9 toneladas anuales de CH generadas como residuo, las cuales son enviadas directamente al relleno sanitario sin algún tratamiento previo.

### ***1.1.1. Formulación del problema***

¿Los factores concentración de papaína y tiempo de hidrólisis, influyen de manera directa sobre el porcentaje de rendimiento del AH?

## **1.2. Justificación**

El huevo se ha convertido en uno de los alimentos más consumidos a nivel mundial y específicamente en Colombia, el consumo per cápita en los últimos años ha estado en aumento alcanzando las 334 unidades en el 2021 (FENAVI, 2022). Actualmente, la CH es un desecho orgánico abundante que generalmente va directo a los rellenos sanitarios.

Con la iniciativa de reducir la contaminación y la carga residual en la región sur de Colombia, se plantea aprovechar las 3.029 toneladas de CH generada como residuo en la industria panificadora del departamento de Nariño, lo cual representa un alto flujo residual, aprovechando las propiedades presentes en la MCH para darle un valor agregado a este residuo orgánico.

En la CH de gallina se encuentran muchos componentes, entre ellos la MCH, la cual es rica en AH, perteneciente a la familia de los glicosaminoglicanos. El AH es un polisacárido lineal con disacáridos, ácido D-glucurónico y N-acetil-d-glucosamina, ubicado en la matriz extracelular. Presenta una polaridad alta ya que es un reservorio importante de agua en la dermis; lo que aporta elasticidad al tejido intracelular y participa en la hidrogénesis, es decir, que ambos componentes aportan integralidad a la estructura de la piel (Bedoya Salazar & Valencia González, 2020), teniendo en las últimas décadas mayores aplicaciones en el área médica, con buenos resultados y pocos efectos adversos.

Con lo mencionado anteriormente, el objetivo es aprovechar este residuo potencial, definiendo como principal mercado la industria cosmética, la cual es de gran importancia para la economía colombiana teniendo en cuenta que la mejora de la apariencia física para cumplir ciertos estereotipos, crea una necesidad de consumo que justifica las cifras de ventas inalcanzables en otros sectores, ya que este mercado ha estado en constante crecimiento desde el año 2000 y en el año 2020, se exportaron más de 143 millones de dólares estadounidenses en productos de maquillaje, productos de belleza y cuidado para la piel, donde sumado a el interés de compra de productos de origen natural por sus beneficios como ser menos propensos a causar irritaciones o reacciones alérgicas, menor contenido de químicos agresivos con el tejido cutáneo y debido a la conciencia ambiental que ha aumentado con el pasar de los años, considerando en cuenta las tendencias del mercado actual (Khanmohammadi et al., 2014).

Colombia, al ser el segundo país con mayor biodiversidad en todo el mundo se convierte en una principal fuente tanto de productos industriales como artesanales y es aquí donde se busca implementar los beneficios y propiedades de algunas materias primas de fácil acceso como lo es la CH y sus propiedades para la creación de productos cosméticos, ya que para en el 2032 se pronostica que Colombia será reconocida como un líder mundial en producción y exportación de productos cosméticos (Cabrera Báez et al., 2017) buscando fortalecer éste sector en temas de

producción, innovación y distribución para ser considerado como una pieza clave en la industria química gracias a su aporte tanto a la producción como a la generación de empleo a nivel nacional.

### **1.3. Objetivos**

#### **1.3.1. Objetivo general**

Evaluar el rendimiento y uso del ácido hialurónico obtenido a partir de la membrana de la cáscara de huevo de gallina, tipo blanco y rosado generado como residuo en la panadería Opti Pan.

#### **1.3.2. Objetivos específicos**

- Caracterizar fisicoquímicamente la membrana de cáscara de huevo de gallina blanco y rosado.
- Establecer condiciones de proceso para la obtención y cuantificación de ácido hialurónico presente en la membrana de cáscara de huevo de gallina blanco y rosado.
- Caracterizar fisicoquímicamente el ácido hialurónico obtenido a partir de la membrana de cáscara de huevo de gallina blanco y rosado.
- Evaluar el uso del ácido hialurónico presente en la membrana de cáscara de huevo de gallina, tipo blanco y rosado en la obtención de un sérum para uso cosmético.

### **1.4. Marco referencial o fundamentos teórico**

#### **1.4.1. Antecedentes**

**1.4.1.1. Extracción secuencial de ácido hialurónico y colágeno de la membrana de cáscara de huevo de gallina.** Se realizó una obtención de AH mediante una mezcla con solución salina digestión enzimática con papaína, donde se obtuvo un mayor rendimiento, 5,48 mg/g, con muestras incubadas a 60°C. Tras la extracción de AH se extrajo colágeno a partir de las muestras residuales con soluciones de ácido acético variando niveles de pH. Se realizó una obtención de AH mediante una mezcla con solución salina digestión enzimática con papaína, donde se obtuvo un mayor rendimiento, 5,48 mg/g, con muestras incubadas a 60°C. Tras la extracción de AH se extrajo colágeno a partir de las muestras residuales con soluciones de ácido acético variando niveles de pH.

El mayor rendimiento de colágeno fue de 38 mg/g, y se obtuvo a 20°C, pero disminuyó al incrementar la temperatura de incubación, probablemente debido a un proceso de desnaturalización (Alparce et al., 2018).

**1.4.1.2. Cordones umbilicales residuales, nueva fuente de obtención de ácido hialurónico y sus fracciones.** Se propuso una metodología para el aprovechamiento de los cordones umbilicales residuales, que se generan como subproducto del proceso de elaboración del gel fotoprotector y obtener AH biológicamente activo, a través de solución salina y AH purificado mediante precipitación del polisacárido con etanol, obteniendo un rendimiento de 0,12 % p/p (Lago Mendoza, 2007).

**1.4.1.3. Comparación de hidrólisis enzimática de polisacáridos en membrana de cáscaras de huevo.** Se realizó la extracción de AH de las MCH mediante hidrólisis enzimática con papaína, tripsina y pepsina obteniendo el mejor rendimiento de 4,5% en el proceso de hidrólisis con tripsina a 37° C y pH 8 (Ürgeová & Vulganová, 2016).

**1.4.1.4. Extracción y caracterización de ácido siálico, sulfato de condroitín y sulfato de dermatán presentes en tejidos de pollo de engorde mexicano (cresta, piel y cartílago del esternón).** Se planteó un proceso de digestión enzimática con papaína, buscando extraer glucosaminoglicanos a partir de la cresta, piel y cartílago del esternón de pollos de engorde mexicanos, obteniendo el mayor rendimiento de Ácido siálico en los cartílagos del esternón con un 5,52% en el proceso de hidrólisis enzimática con papaína (Pulido Córdoba, 2009).

**1.4.1.5. Optimización del método de extracción de ácido hialurónico del humor vítreo de *Oreochromis niloticus*.** Se evaluaron dos métodos, químico y enzimático para la extracción de AH usando humor vítreo de residuos acuícolas como material biológico, obteniendo el mayor rendimiento (0,008%) con hidrólisis enzimática con papaína, a diferencia que en el método químico el rendimiento de extracción fue de 0,0022% (Pérez Gumeta et al., 2018).

**1.4.1.6. Extracción a escala de laboratorio del complejo de proteínas presentes en las membranas intersticiales de residuos de cáscara de huevo de gallina (*Gallus Domesticus*) mediante el proceso de hidrólisis alcalina.** Se realizó la obtención proteica presente en las MCH de residuos de CH mediante una hidrólisis alcalina, para lo cual, por diferencia de densidades se separó la MCH. Con este proceso se concluye que las MCH son una fuente significativa de

proteína, ya que contienen aproximadamente 71,19% p/p de proteína, mientras que en la fase mineral se hallaron altas concentraciones de calcio, alcanzando valores de 94 mg Ca/g CH (Urbano Vargas, 2015).

**1.4.1.7. Desarrollo de un yogurt bebible enriquecido con péptidos bioactivos de la hidrólisis enzimática de proteínas de suero lácteo utilizando papaína.** El objetivo de esta investigación fue determinar la vida de anaquel sensorial de un producto lácteo tipo yogurt bebible rico en péptidos inhibidores de enzima (ECA) obtenidos a través de un proceso de hidrólisis enzimática de proteínas de suero lácteo utilizando papaína, logrando un porcentaje de inhibición del 70% de ECA a una temperatura de 75°C y un pH de 5,0 (Vera Valle, 2017).

**1.4.1.8. Capacidad antioxidante de péptidos obtenidos de hidrolizados de tilapia con bromelina y papaína.** Usando restos de fileteado de tilapia con extractos de piña y papaya se realizó un proceso de hidrólisis enzimática, con el objetivo de evidenciar que dichos restos, contienen péptidos bioactivos con capacidad antioxidante, obteniendo un mayor rendimiento de generación de péptidos entre las 24 y 48 h a 37°C (Mendoza et al., 2016).

**1.4.1.9. Estrategia de optimización secuencial para la extracción de ácido hialurónico de la cáscara de huevo y su caracterización parcial.** Se optimizó un proceso de obtención de AH de la CH mediante una experimentación secuencial variando el pH y tiempo de extracción, de los cuales se obtuvo el rendimiento más alto de AH de 5,3 mg AH/g CH a 9°C con pH de 3,5 (Khanmohammadi et al., 2014).

**1.4.1.10. Extracción de MCH con solución de NaCl.** Las MCH se llevan a suspender en solución de NaCl (0,5M), donde se somete a agitación durante el tiempo indicado, para una posterior decantación y centrifugación de la solución obtenida (Callejas Quijada et al., 2023).

**1.4.1.11. Extracción AH con ácido acético a partir de las cáscaras de huevo de gallina.** Las CH se llevan a un proceso de triturado a un tamaño de partícula de 0,5 mm. El ácido acético (4 M) es añadido junto con las partículas obtenidas del molino en una relación 1:1. El AH se obtiene como precipitado con igual volumen de isopropanol (Khanmohammadi et al., 2014).

**1.4.1.12. Desinfección de huevo comercializable mediante soluciones acuosas activadas químicamente con plasma.** El proceso de lavado, desinfección, y almacenamiento adecuado de las CH es una metodología convencional para la mitigación de microorganismos que afecten el

resultado de un producto de interés. Según Pivovarov et al., (2022) una manera eficaz de eliminar los microorganismos más convencionales en las CH o en la superficie del huevo de gallina es utilizando soluciones que contienen un componente activo, como el peróxido de hidrógeno, con concentraciones que varían entre 100 y 700 mg/l. Sin embargo, según Gole et al., (2014) el método anteriormente descrito puede afectar los componentes y proteínas presentes en la CH y la MCH, por lo tanto, se empleará el método de desinfección con hipoclorito de sodio descrito en la investigación de Wang & Slavik, (1998).

**1.4.1.13. Desarrollo y validación de un método HPLC para determinación de la sustancia activa de ácido hialurónico en formulaciones farmacéuticas.** El estudio se enfocó en desarrollar y validar un método analítico para determinar el ácido hialurónico en forma farmacéutica. El método se validó en cuanto a idoneidad del sistema, linealidad, límites de detección (LOD) y cantidad (LOQ), precisión, exactitud, especificidad, selectividad y estabilidad y los hallazgos obtenidos mostraron que el método analítico tiene una linealidad superior a 0,99 de precisión, exactitud, selectividad y estabilidad. El método demostró ser preciso, exacto y específico durante el estudio (Çağlar et al., 2022).

**1.4.1.14. Determinación de hialuronato de sodio en formulaciones farmacéuticas mediante HPLC-UV.** Se desarrolló un método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección UV para la determinación de hialuronato de sodio en una formulación farmacéutica. La detección se llevó a cabo utilizando un detector UV-vis de longitud de onda variable configurado a 205 nm. El método desarrollado se aplicó a la determinación de hialuronato de sodio en una sustancia farmacéutica y en el producto (Ruckmani et al., 2013).

**1.4.1.15. Cuantificación de ácido hialurónico y metilsulfonilmetano en suplementos dietéticos.** Este estudio se centró en desarrollar y validar pruebas para analizar simultáneamente dos de estos componentes, el ácido hialurónico y el MSM, y así determinar su cantidad en una muestra combinada. El método fue lineal ( $r= 0,9998$ ) en el rango de 4000 a 15000 ppm y los LOD y LOQ fueron 332,90 y 1109,67 ppm, respectivamente (Harmita et al., 2020).

**1.4.1.16. Evaluación de la eficacia de suero tópico de ácido hialurónico en el fotoenvejecimiento facial.** El estudio investigó los efectos de un suero facial de ácido hialurónico en la fotoenvejecimiento facial, donde se incluyeron cuarenta mujeres de 30 a 65 años con diversos

tipos de piel y signos de foto envejecimiento. Se realizaron mediciones de corneometría y se tomaron muestras faciales y fotografías en momentos específicos. Los resultados indicaron una mejora significativa en la hidratación, suavidad, volumen y apariencia general de la piel, respaldando la eficacia del suero de AH en el tratamiento de la foto envejecimiento facial (Draeos et al., 2021).

#### **1.4.2. Marco teórico**

**1.4.2.1. Glicosaminoglicanos.** Los glucosaminoglucanos se caracterizan por ser factores muy importantes en el tejido de la piel y se utilizan como agentes anticoagulantes, antitumorales y antiinflamatorios. Entre sus aplicaciones más importantes, se destaca que promueven el crecimiento y la regeneración celular. Entre los componentes del MCH, el AH es considerado uno de los más apreciados y buscados en campos como: cosmética, clínica y médica (Alparce et al., 2018).

**1.4.2.2. Cáscara de huevo de gallina.** La CH se caracteriza por ser una estructura biomineral que protege el contenido interno, cumple la función de ser una reserva mineral para el embrión aviar, cumpliendo la función de intercambiar agua y gas entre ambiente externo y embrión, misma capacidad que se debe gracias a la composición proteica de la cutícula (Shahnila et al., 2022).

**1.4.2.3. Membrana de cáscara de huevo.** Las MCH se caracterizan por poseer una estructura fibrosa compuesta por una red de biopolímeros, situada entre la CH y la albúmina del huevo (N. Mendoza et al., 2022). La MCH es un producto rico en colágeno, AH, condroitina, glucosamina, queratina y lisozima, su principal función es activar el desarrollo de los fibroblastos en el tejido cutáneo, mismos que contribuyen a la producción de colágeno y adicionalmente, posee un glucosaminoglicano, que corresponde al AH (Bayer, 2020).

**1.4.2.4. Papaína.** La papaína es una poderosa enzima digestiva que a menudo se encuentra y se extrae de la fruta de papaya (*Carica papaya*); también se le conoce como proteinasa de papaya. La enzima de papaya juega un papel vital en el proceso digestivo al participar en el procesamiento de fibras proteicas fuertes. La papaína desempeña un papel muy importante en la descomposición de toxinas y es un poderoso agente antiséptico, digestivo, antioxidante e inflamatorio (Food News Latam, 2018).

**1.4.2.5. Enzimas.** El CH se caracteriza por ser una estructura biomineral que protege el contenido interno, cumple la función de reserva mineral del embrión de ave y realiza el intercambio de agua y gases entre el medio externo y el embrión (Bhatia, 2018). La combinación de grupos funcionales químicos en el sitio activo da paso a la creación de interacciones covalentes y no covalentes entre la proteína y el sustrato; mismas que favorecen la conversión de sustratos en productos (Ramírez Ramírez, 2014).

**1.4.2.6. Cosmetología.** Actualmente, el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA) define los productos cosméticos como "una sustancia o formulación de aplicación local para ser utilizada en las diferentes partes superficiales del cuerpo humano: epidermis, sistema piloso y capilar, uñas, labios y órganos genitales, uñas, labios y órganos genitales". Es importante recalcar que los productos cosméticos no poseen propiedades farmacológicas, al contrario, sus principales funciones son limpiar, perfumar, proteger, decorar y modificar el aspecto, pero de ninguna forma sanar enfermedades. Se considera como cosméticos, los productos tales como: cremas, emulsiones, lociones, geles y aceites para la piel, máscaras de belleza, maquillaje, jabones de tocador, perfumes y colonias, antitranspirantes, productos para la salud bucal y de las uñas, bronceadores y productos antiarrugas (Márquez Polo, 2021).

**1.4.2.7. Hidrólisis Enzimática.** La hidrólisis enzimática se caracteriza por ser un proceso químico en el que las moléculas se descomponen mediante la adición de agua con la ayuda de enzimas, mismas que son proteínas que actúan como catalizadores biológicos, acelerando el efecto de las reacciones químicas. En este proceso, las enzimas facilitan la ruptura de enlaces químicos específicos en las moléculas, permitiendo que el agua se introduzca en su estructura, provocando una división de la molécula inicial en componentes más simples (EduMedia, 2024). El concepto de hidrólisis enzimática en el área de química orgánica hace referencia a una ruptura de un enlace por la incorporación de iones de agua en los productos de interés (Campos, 2015 y Flores et al., 2008). Este proceso se lleva a cabo por enzimas mejor conocidas como "hidrolasas", mismas que producen una ruptura de enlaces por agua (BRF Ingredients, 2022).

**1.4.2.8. Ácido hialurónico.** Es un polisacárido presente de manera natural en el cuerpo humano y que, gracias a su estructura molecular, presenta una alta capacidad de retención de agua, contribuyendo significativamente a la hidratación y lubricación de los tejidos. Este componente

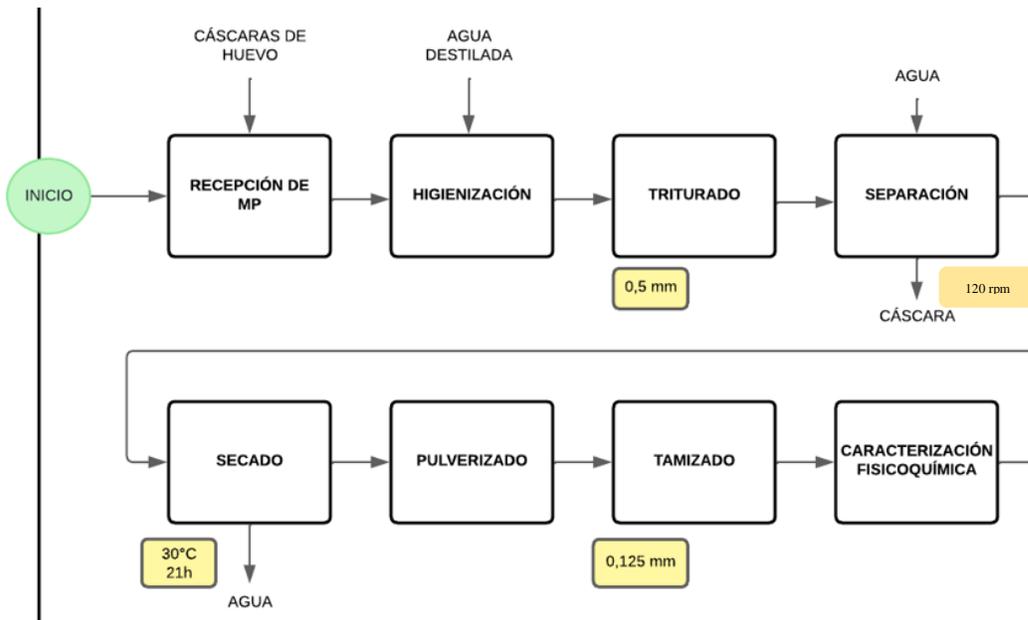
también desempeña un papel importante en la regulación de la matriz extracelular y la cicatrización de heridas (Necas et al., 2008 y ŠMejkalová et al., 2015).

### 1.5. Metodología

El AH se extrajo de la MCH realizando una hidrólisis enzimática, mediante un diagrama de bloques de la Figura 1, 2, 3 y 4 se describe la metodología experimental para la extracción del glucosaminoglicano (Alparce et al., 2018).

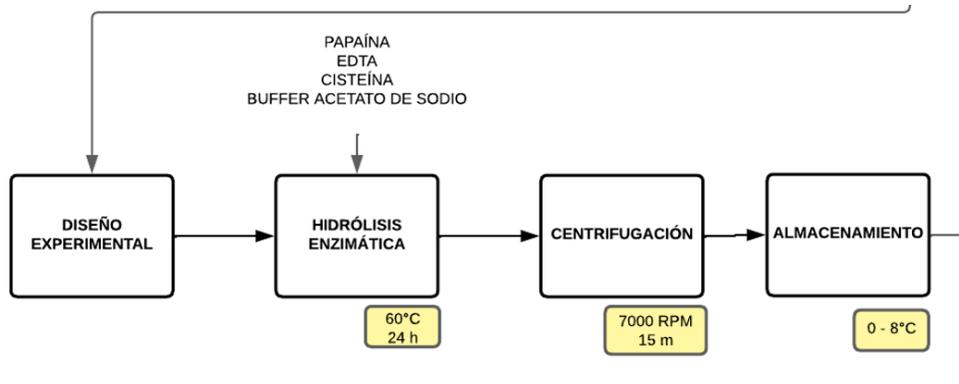
**Figura 1**

*Metodología objetivo 1: Caracterización fisicoquímica de la MCH*



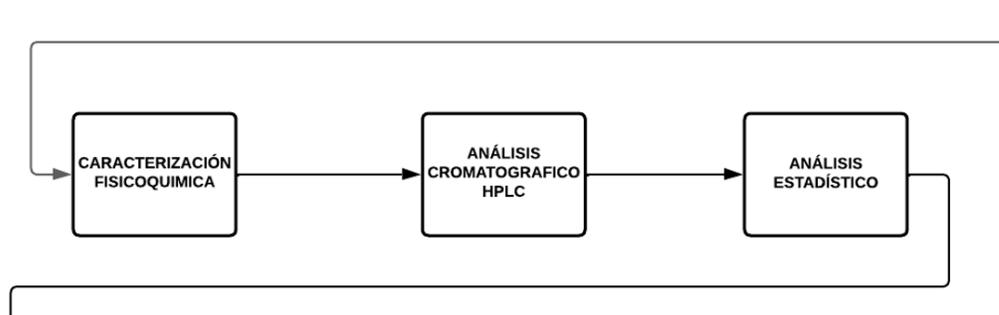
**Figura 2**

*Metodología objetivo 2: Establecimiento de las condiciones para la obtención y cuantificación del AH*



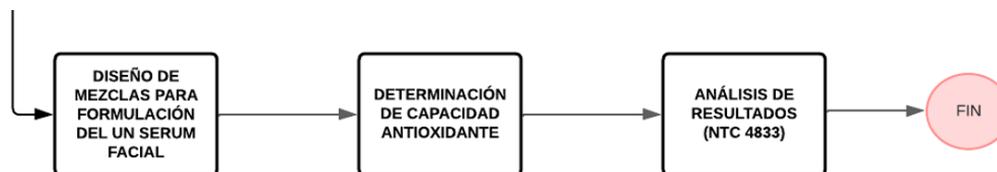
**Figura 3**

*Metodología objetivo 3: Caracterización fisicoquímica del AH*



**Figura 4**

*Metodología objetivo 4: Formulación de un sérum facial*



### 1.5.1. Metodología para cumplir primer objetivo específico

**1.5.1.1. Revisión bibliográfica.** Para la recopilación de información científica relacionada con el marco teórico y la metodología, se emplearon las plataformas de Scopus y SciELO, las cuales fueron accesibles a través de la biblioteca virtual de la Universidad Mariana. Además, se

llevó a cabo una búsqueda exhaustiva de artículos científicos provenientes de revistas indexadas, así como de tesis y trabajos de investigación pertinentes, la recopilación de información con 10 años anteriores al año actual 2024.

**1.5.1.2. Recolección de materia prima.** Las CH de gallina tipo blanco y rosados se obtuvieron de la panadería Opti Pan, en San Juan de Pasto - Nariño, en un tamaño de muestra de 1.000 g CH, ya que es el promedio de generación de residuo en un día normal de producción, misma cantidad que es suficiente para proceder a realizar los posteriores análisis en este estudio, las cuales se dispondrán en bolsas ziplock conservando una temperatura de almacenamiento entre 0-15 °C y protegidos de la luz para evitar contaminación microbiana en las CH (Aditya et al., 2021 y Chávez Feijoó, 2021). La recolección se realizó aproximadamente en los días sábado y domingo, donde se evidenció una mayor generación de residuos, respecto a los demás días, debido a una alta demanda de productos de pastelería en un fin de semana.

**1.5.1.3. Triturado.** Para facilitar la manipulación de la materia prima en los siguientes procedimientos se introdujeron las muestras de CH en el molino (Victoria VH 750-C, 1.680 rpm) para conseguir un tamaño de partícula de 0,5 mm.

**1.5.1.4. Definición de metodología de separación de MCH.** Mediante un diagrama de decisión donde se compararon metodologías para la separación de las MCH de gallina a partir del residuo recolectado en la panadería Opti Pan, cuenta con un puntaje de evaluación para cada criterio: Bajo = 1; Medio = 2; Alto = 3, el método de separación que obtenga el menor puntaje sería el más viable para ser replicado, teniendo en cuenta economía, accesibilidad a equipos y rendimiento obtenido. Opti Pan, una panadería que produce un promedio de 16,2 kg de residuos de CH de gallina semanal, requiere que estos residuos se almacenen a temperaturas entre 0-15 °C y se protejan de la luz (Chávez Feijoó, 2021).

**1.5.1.5. Higienización de la CH.** Los residuos de CH se sometieron a un proceso de higienización adecuado para mitigar la carga microbiana de *Salmonella spp.* se llevó a cabo un lavado utilizando una solución de hipoclorito a una concentración de 0.16% [v/v] que equivalía a aproximadamente 200 ppm (Wang & Slavik, 1998).

**1.5.1.6. Separación de MCH.** Después de completar el tratamiento de las CH, se realizó una comparación exhaustiva entre los distintos métodos de separación de MCH de gallina en investigaciones previas, teniendo en cuenta los siguientes factores:

- Objetivo del estudio: se requiere separar la MCH para un análisis fisicoquímico de ella y sus componentes, por lo que se tendrá en cuenta los siguientes factores:
  - Preservación de la integridad de la MCH: evitando alteraciones en su composición estructural y bioquímica.
  - Eficiencia: para el procesamiento de ciertas cantidades de MCH en el menor tiempo posible.
  - Disponibilidad de recursos: Al tener en cuenta metodologías existentes, es importante contar con los reactivos, equipos y condiciones específicas del proceso.
  - Referencias y validación: Es de suma importancia verificar si la metodología a utilizar ha sido previamente utilizada y validada en investigaciones con objetivos similares.

**1.5.1.7. Secado de la MCH.** Luego de extraer la mayor cantidad de MCH posible, las muestras se llevaron al secador de bandejas (FIQ LTDA) durante 21 horas a 30°C para eliminar la mayor cantidad de agua que las MCH puedan contener (Stephanie, 2021; Urbano Vargas, 2015).

**1.5.1.8. Pulverizado.** Las muestras secas de MCH se llevaron al molino de cuchillas (Knife Mill PULVERISETE 11) a 10.000 rpm durante 2 minutos

**1.5.1.9. Tamizado.** Con ayuda de un juego de tamices de la serie ASTM tamizador, se buscó obtener una distribución mayor entre las mallas #16 y #20 que establece un tamaño de partícula entre 0,84 y 1,19 mm.

**1.5.1.10. Caracterización fisicoquímica.** Se realiza el análisis de las siguientes características fisicoquímicas.

**1.5.1.10.1. Acidez titulable.**

AOAC 942.15: Después de realizar el pulverizado a la muestra, se coloca 2 g de MCH en un matraz con 100 mL de agua destilada, se llevará hasta el punto de ebullición durante una hora y se renovará el agua perdida por evaporación, se colocará a enfriar a temperatura ambiente para cambiarlo a un matraz aforado de 500 mL. Este se dejará en reposo mientras está en agitación, se tomó una porción

de 20 mL del filtrado y se titulará con una solución de hidróxido de sodio 0,01 N, utilizando 0,3 mL de indicador de fenolftaleína, para observar el cambio de incoloro a rosa (Godoy et al., 2016)

#### **1.5.1.10.2. Humedad.**

AOAC 930.15: Se pesa 3 g de MCH en una balanza analítica y se colocan en una estufa a  $100 \pm 5$  °C. Durante 24 horas, transcurrido el tiempo se tapaná el recipiente y se ubicará en un desecador por 5 minutos. Se registrará el peso final y el porcentaje de humedad para determinar a partir de la diferencia de pesos (Thiex, 2009).

#### **1.5.1.10.3. Densidad.**

AOAC 962.37: Para determinar el peso del agua y de la muestra a volumen constante, se utilizará el picnómetro a 27 °C mediante un baño térmico (Pineda et al., 2023).

### **1.5.2. Metodología para cumplir segundo objetivo específico**

**1.5.2.1. Suspensión.** Las MCH se dejarán en suspensión en una solución de 5mM de cisteína (5,00 mg: 1 g MCH), 5 mM de EDTA (etilendiaminotetraacético) (4,50 mg: 1 g MCH), 100 mM de buffer de acetato de sodio (4,30 mg: 1 g MCH) durante una hora a temperatura ambiente (Alparce et al., 2018).

**1.5.2.2. Digestión enzimática con papaína.** Se realizó una breve descripción de metodologías existentes para la extracción de AH en el marco teórico, teniendo en cuenta accesibilidad a equipos y reactivos, procesamiento de grandes cantidades para un escalamiento de procesos y rendimientos de producción. Teniendo en cuenta la anterior comparativa, se opta por la extracción por hidrólisis enzimática con papaína, ya que indica un rendimiento de extracción alto respecto a la extracción con pepsina. Cabe resaltar que, según investigaciones la extracción con tripsina presenta un mayor rendimiento al de la papaína. Sin embargo, se decide realizar la extracción usando la enzima de papaína, ya que presenta un menor costo operativo al de la tripsina, llevando a un beneficio económico de la investigación en un futuro. Así mismo, estudios han confirmado que la digestión enzimática con papaína no extrae proteínas como el colágeno, presentando un punto positivo, ya que conserva las proteínas en las MCH.

La papaína actúa hidrolizando los enlaces peptídicos de las proteínas, rompiéndolas en fragmentos más pequeños. Esto permite que el ácido hialurónico, que está unido a estas proteínas, se disuelva y se libere en la solución (Leong et al., 2023).

Posterior a la suspensión, se lleva al agitador magnético con calentamiento (MS-H280-PRO) y mientras se somete a agitación, se añade la papaína en una relación de (20 mg: 1 g MCH) para llevarlo a 60°C teniendo en cuenta los lineamientos del diseño experimental, los cuales indican 27 muestras.

**1.5.2.3. Centrifugación.** Después de la digestión enzimática, la mezcla se llevará a la centrífuga (Becton Dickinson Clay Adams Compact II) a 7.000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante es recolectado con ayuda de una micropipeta de 10 mL (Digipette MGB-009) para ser depositado en recipientes para muestras.

**1.5.2.4. Almacenamiento.** Los recipientes que contienen las muestras se conservarán en un refrigerador entre 2 y 8°C para su posterior tratamiento y caracterización (Mensah et al., 2023).

**1.5.2.5. Diseño experimental.** Con el propósito de establecer las mejores condiciones para el proceso de hidrólisis enzimática, en esta investigación se implementará un diseño factorial  $3^k$  (2 factores con 3 niveles) de la siguiente manera:

- Factor 1. Tiempo con 3 niveles (8, 16 y 24 horas)
- Factor 2. Concentración de enzima (papaína), 3 niveles (10, 20 y 30 mg: g MCH).

Las unidades experimentales estarán compuestas por 50 g de MCH y cada ensayo se realizará por triplicado para un total de 27 corridas, como variable de respuesta se tiene el contenido de AH (mg/L). Se recopilan datos de un total de los 9 puntos muestrales, todos llevados a cabo a una temperatura constante de 60°C y utilizando una concentración variable en la relación papaína de 10, 20 y 30 mg: 1 g MCH.

**1.5.2.6. Análisis de diseño experimental.** El diseño se evaluará a través de un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza de 95% ( $\alpha=0,05$ ) y se procederá a efectuar una comparación de medias mediante prueba de Tukey (0,05) utilizando el software estadístico gratuito Statgraphics 19R Centurión y el software de programación Python con el fin de comprobar si existen diferencias significativas entre las medias de los factores evaluados sobre la respuesta.

### 1.5.3. Metodología para cumplir tercer objetivo específico

**1.5.3.1. pH.** AOAC 981.12: En un beaker de 250 mL se coloca 10 mL de muestra de AH y se mide el pH con un potenciómetro (Titroline 5000) de electrodos previamente calibrado previamente con tres tipos de buffers 4, 7 y 10 para tener mayor precisión, los valores son reportados con dos decimales (Ruiz et al., 2023).

**1.5.3.2. Análisis cromatográfico HPLC.** Empleando el equipo de cromatografía líquida HPLC Thermo Scientific UltiMate 3000 RS tomando como referencia las investigaciones Çağlar et al., (2022) y Ruckmani et al., (2013) y a condiciones indicadas en la Tabla 1, y una solución patrón de AH tipo comercial, del cual se obtendrá un cromatograma y un valor del área bajo la curva (ABC), para posteriormente correlacionar los resultados de ABC con la concentración del compuesto en muestras de 10 mL de extracto de AH obtenidas del diseño factorial, resultado el cual determinará la presencia y contenido de AH en las muestras, producto de la hidrólisis enzimática.

**Tabla 1**

*Especificaciones para la cuantificación del AH en el cromatógrafo HPLC*

<b>Equipo:</b>	HPLC Thermo Scientific Ultimate 3000 RS
<b>Columna:</b>	Zorbax Eclipse Plus C18
<b>Fase móvil:</b>	Agua (20%) - Acetonitrilo (80%)
<b>Flujo:</b>	0,60 mL/min
<b>Temperatura:</b>	55 °C
<b>Volumen de inyección</b>	10 µL
<b>Detectores:</b>	UV-vis / RI (255 nm)

### 1.5.4. Metodología para cumplir cuarto objetivo específico

**1.5.4.1. Formulación de sérum facial.** Como se mencionó anteriormente, el AH actúa como un humectante biológico y posee propiedades antioxidantes que contribuyen a la disminución en el proceso de envejecimiento del tejido cutáneo, estimulando la producción de colágeno y reduciendo signos de la vejez como las líneas de expresión y arrugas (Draeos et al., 2021).

Se deben tener en cuenta componentes que cumplan características funcionales esenciales de un producto cosmético de este tipo, esto quiere decir que, en la composición del producto facial, deben incluirse humectantes, conservantes naturales, una fragancia o aroma, un emulsionante y un disolvente.

Por otra parte, se ha realizado un diseño de mezclas empleando el software estadístico Statgraphics 19R Centurión el cual establecerá un diseño adecuado para evidenciar el efecto de 3 componentes en 15 corridas para un total de 95% en composición con las variables: AH, agua destilada y glicerina, cabe resaltar que el 5% restante será ácido ascórbico cuya concentración se mantendrá constante, evitando un efecto directo de esta variable, siguiendo las directrices de Serra & Cafaro, (2007), donde menciona que el ácido ascórbico posee la capacidad de regenerar vitamina E, y por ende contribuye a la acción antioxidante. Como variable de respuesta se tiene la capacidad antioxidante expresada en porcentaje (%), como se puede evidenciar en la **Tabla 2**.

El orden de los experimentos del diseño es completamente aleatorio, lo que brinda protección contra la influencia de variables ocultas, ya que el modelo seleccionado es cuadrático.

**Tabla 2**

*Diseño base de las corridas para el Sérum*

Componentes	Bajo	Alto	Unidades
AH	1	4	%
Agua destilada	70	76	%
Glicerina	18	21	%

**1.5.4.2. Análisis de resultados bajo la NTC 4833, 2012.** Para reconocer un producto cosmético con un nivel de riesgo microbiano reducido, es importante seguir los lineamientos de la normativa ISO 29621, la cual describe características fisicoquímicas que previenen la propagación de microorganismos en productos de cosmética.

Con ayuda del potenciómetro, se mide la alcalinidad de la muestra, donde el pH debe estar entre 3 y 10, en la formulación del producto se debe tener un contenido de agua  $\leq 0,75$ , con un envasado

final a temperatura  $\geq 65,0$  °C y, por último, se recomienda usar productos de base solvente, productos oxidantes o clorhidrato de aluminio y sales relacionadas del 15 al 25% en el producto.

Se introduce 1,0 mL de cada ensayo por triplicado en tubos de ensayo, en seguida se adiciona 1,0 mL de tampón acético y 0,5 mL de radical de DPPH (1, 1diphenyl-2-picryl hydrazyl) en etanol para una posterior agitación en un agitador vortex Four E'S Scientific MI0101002, cubiertos con parafin y dejando reposar por 30 minutos a temperatura ambiente.

**1.5.4.3. Determinación de capacidad antioxidante.** Se introduce 1,0 mL de cada ensayo por triplicado en tubos de ensayo, en seguida se adiciona 1,0 mL de tampón acético y 0,5 mL de radical de DPPH (1, 1diphenyl-2-picryl hydrazyl) en etanol para una posterior agitación en un agitador vortex Four E'S Scientific MI0101002, cubiertos con parafin y dejando reposar por 30 minutos a temperatura ambiente (Nerdy & Manurung, 2018).

Se procede a medir la absorbancia en el espectrofotómetro Thermo Scientific-Genesys 10S UV-VIS con una longitud de onda de 517 nm teniendo en cuenta las investigaciones de (Baliyan et al., 2022; Otohinoyi et al., 2014).

Se determinará la capacidad antioxidante de las mezclas de sérum realizadas empleando el método DPPH, ya que aborda una metodología bastante eficiente y asequible para la medición de las propiedades antioxidantes, las cuales incluyen el uso de los radicales libres (RS) utilizados para evaluar el potencial de las sustancias, con la función brindar hidrógeno o ser eliminadores de RS (Goyal & Shekhar Tailor, 2014).

La evaluación de la actividad antioxidante (A.A) se realiza mediante el método DPPH, que consiste en agregar este reactivo a la muestra tomada, la absorbancia se determina mediante un espectrofotómetro a una longitud de onda de 517 nm. Los resultados se expresan en unidades estándar de micro moles de Trolox equivalente por cien gramos de sérum ( $\mu\text{M TE}/100$  g Sérum).

En la investigación de (García et al., 2012) el porcentaje de capacidad antioxidante se determina con la **Ecuación 1** la cual relaciona la absorbancia de la mezcla base como ABS blanco y la mezcla con DPPH como ABS mezcla:

*Ecuación 1 Cálculo de capacidad antioxidante*

$$\% AA = \frac{A_{t0} - A_{tf}}{A_{t0}} * 100$$

Fuente: (Vallejo Castillo et al., 2020)

## 2. Presentación y discusión de resultados

### 2.1. Cumplimiento del primer objetivo

#### 2.1.1. Definición de metodología de separación de MCH

Como se puede evidenciar en la Tabla 3, se realizó una comparativa de criterios anteriormente descritos, los cuales se obtuvieron resultados cuantificativos que ayudaron a tomar una decisión informada con respecto a la elección de la metodología más adecuada para el propósito de la investigación, proporcionando una base sólida para la selección de un enfoque específico

**Tabla 3**

*Diagrama de decisión de los métodos de separación de MCH.*

Criterios de evaluación	Separación por ultrasonido (Jain y Anal, 2016)	Separación química con HCl (Chávez, 2021)	Separación por diferencia de densidades (Urbano, 2015)
	Puntaje		
Reactivos	1	3	1
Equipos especializados	3	2	2
Alteración de las proteínas presentes	3	3	1
Generación de sustancias residuales	1	2	1
Procesamiento de gran cantidad de MCH	3	3	1
Tratamientos posteriores necesarios	3	3	1
Total	14	16	7

*Nota:* Se cuenta con unos criterios de evaluación que son valor de puntaje: Bajo = 1; Medio = 2; Alto = 3)

Se realizó una escala de evaluación con 3 niveles: requerimiento bajo, medio y alto, de orden 1,2 y 3, respectivamente. Al final de la evaluación, el método de separación que obtenga el menor puntaje sería el más viable para ser replicado, teniendo en cuenta economía, accesibilidad a equipos y rendimiento obtenido.

Por otra parte, la separación química con HCl obtuvo el puntaje más alto, presentando inconvenientes como: alto consumo de reactivos, ya que dependerá de la cantidad de residuo que se desee procesar, adicionalmente, este proceso requiere de procesos posteriores para que los reactivos utilizados sean retirados de las MCH, significando sobre costes en la investigación, como se menciona en la investigación de Guo et al., (2011).

Por último, la separación por ultrasonido requiere de equipos e instrumentos adicionales, también se necesita realizar pretratamiento a las CH, ya que se reducirá la fuerza de enlace entre membrana y cáscara, sin embargo, no resulta ser la mejor opción cuando se desee procesar grandes cantidades de CH, según lo descrito en la investigación de (Zhu et al., 2022).

Finalmente, se optó por la metodología de separación por diferencia de densidades desarrollada por Macneil, (2001) y replicado por la investigación de Urbano Vargas, (2015) siendo una manera práctica, económica, no requiere tratamientos posteriores y permite procesar grandes cantidades de residuo de CH.

### **2.1.2. Separación MCH**

*Después del proceso de selección de metodología, se realizó la separación de la MCH a través por diferencia de densidades con ayuda de un tanque de agitación a 120 rpm, en el cual se depositaron 40 L de agua junto a las CH durante 3 minutos hasta que se evidencia que las MCH salen a flote y con ayuda de una manguera plástica se realiza un proceso de decantación, como se muestra en la **Figura 5***

Separación de MCH por diferencia de densidades

## Figura 5

*Separación de MCH por diferencia de densidades*



Se obtuvo un rendimiento de separación de MCH del 10,20 % respecto a la CH, rendimiento que se encuentra dentro del rango de rendimientos descrito en la investigación de Han et al., (2023) y Shi et al., (2021) el cual indica un rendimiento del 5 al 15% de MCH en CH, a diferencia del método descrito en Ponkham et al., (2011), donde se emplea una solución de EDTA 0,5 M pero presenta una desventaja a nivel de procesamiento de grandes cantidades de residuo y el uso de reactivos adicionales, por un porcentaje de rendimiento similar al obtenido en esta investigación.

Una vez separadas las MCH, se llevó a cabo el proceso de deshidratación en un secador de bandejas por un tiempo de 21 horas y a una temperatura no mayor a 30°C. Urbano Vargas, (2015) menciona que, temperaturas entre 40-30°C evita que las proteínas se expongan a un proceso de descomposición como se evidencia en las Figuras 6 y 7. Esta prevención permite una eficacia en la hidrolización enzimática y que las proteínas activas de lugar a la alteración de la estructura cuaternaria, terciaria y secundaria (La Nuez García & Aguirre Gonzáles, 2018).

**Figura 6**

*MCH en secador de bandejas a 30°C*



**Figura 7**

*MCH una vez culminado el secado*



### **2.1.3. Caracterización fisicoquímica**

Se realizó la caracterización fisicoquímica de las MCH por triplicado, evaluando factores como: pH, humedad, densidad, tamaño de partícula y porcentaje de ceniza, con el objetivo de contar con una mejor identificación de la materia prima evaluada, como se puede evidenciar en la **Tabla 4**

**Tabla 4***Caracterización fisicoquímica de la MCH*

<i>Caracterización Fisicoquímica MCH</i>					
<b>Factor</b>	<b>Instrumento</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>Coef. de variación</b>	<b>Unidades</b>
pH	Potenciómetro	7,97	0,59	0,07	<i>UpH</i>
Humedad	Balanza de humedad	10,82	0,25	0,02	%
Densidad	Balanza analítica	0,2	0,02	0,1	<i>g/cm<sup>3</sup></i>
Tamaño de partícula	Malla tamiz #16-#20 ASTM		0,84-1,19		<i>mm</i>
Ceniza	Mufla	79,3	1,64	0,02	%

La caracterización fisicoquímica del MCH (material carbonoso hidrotermal) revela resultados que destacan la consistencia y precisión de las mediciones. El pH, evaluado mediante un potenciómetro, con un valor promedio de  $7,97 \pm 0,59$ , indicando una moderada variabilidad, un valor bastante similar respecto a la investigación de (Wangrunroj et al., 2018) presenta un pH de 7,82 y un resultado distinto respecto al estudio de (Instituto de Estudios del Huevo, 2023), en el cual se menciona que la MCH es alcalina con un pH de 9,5. La humedad indica un promedio del 10,82%, resultado bastante similar al descrito en la patente de (Monferrer Ballester & Cubero Esquinas, 2010), la cual indica un porcentaje de humedad presente en la MCH del 5-8%, lo que indica una coherencia en los resultados obtenidos.

Finalmente, el porcentaje de ceniza, determinado a través de una mufla, muestra un promedio significativo del  $79,39\% \pm 1,64$ , sin embargo, no se logró encontrar un referente bibliográfico donde determinen este factor fisicoquímico y poder comparar el valor obtenido. No obstante, el resultado obtenido demuestra una gran presencia de minerales inorgánicos en la MCH, entre los que se pueden encontrar calcio, fósforo, magnesio o potasio, según lo descrito en la investigación de (Ono & Wakasugi, 1984).

## 2.2. Cumplimiento del segundo objetivo

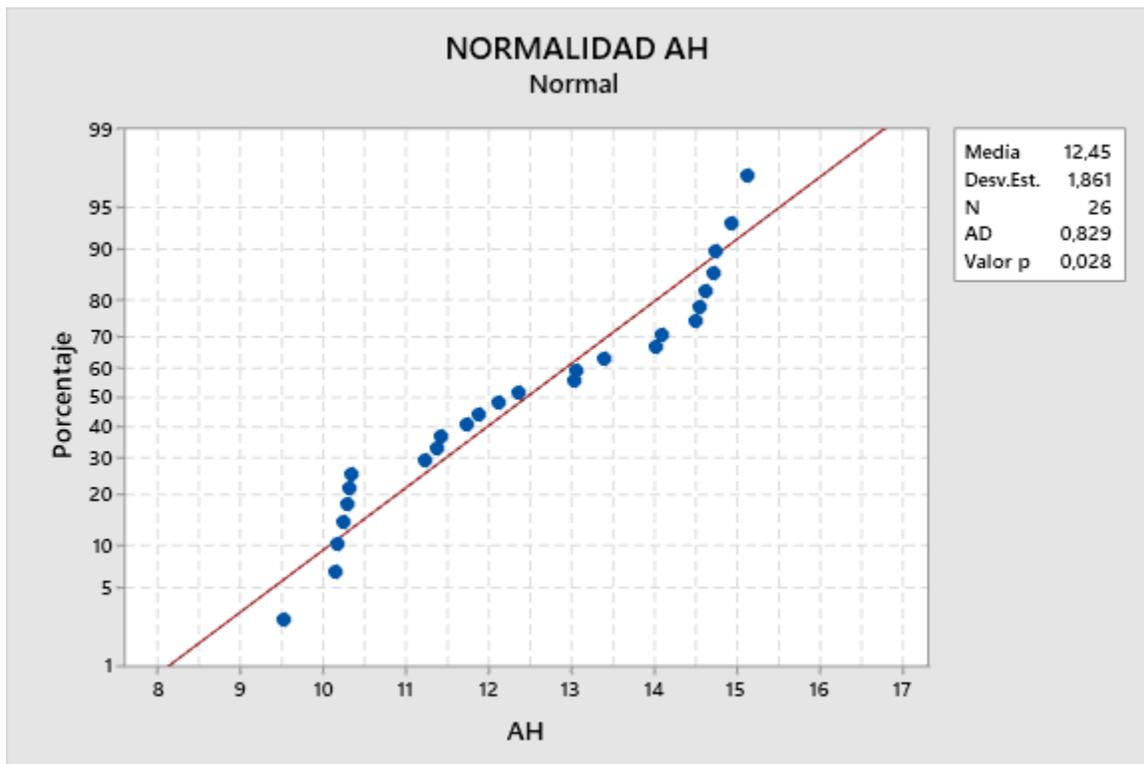
### 2.2.1. Digestión enzimática

Se evaluaron criterios de homocedasticidad y normalidad con ayuda del software Minitab v19 versión de prueba antes de hacer el análisis estadístico, donde se generó una gráfica de probabilidad del contenido de AH en las muestras evaluadas como se puede observar en la **Gráfica 1**. obteniendo un valor p de 0,028 y siendo menor que el nivel de significancia comúnmente utilizado de 0,05 (Tsagris & Pandis, 2021) se podría rechazar la hipótesis nula de que los datos provienen de una distribución normal.

Adicionalmente, se realizó el test de Levene para el contenido de AH respecto a la concentración de papaína, obteniendo un valor p de 0,078, y al ser mayor que 0,05, no se rechazaría la hipótesis nula de que las varianzas son iguales, como se evidencia en la **Gráfica 2**.

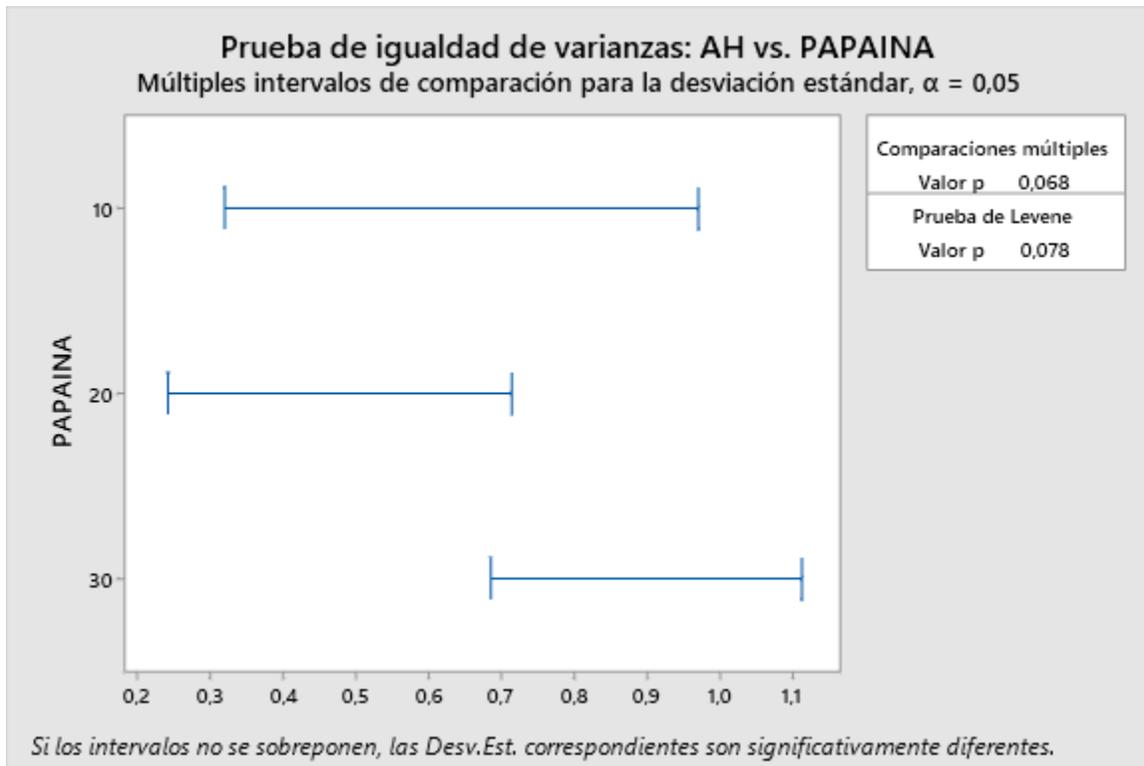
### Gráfica 1

Gráfica de probabilidad de los valores de AH



## Grafica 2

Prueba de igualdad de varianzas.



Se realizó una suspensión con solución de 5mM de cisteína (5 mg: 1 g MCH), 5 mM de EDTA (etilendiaminotetraacético) (4,5 mg: 1 g MCH), 100 mM de buffer de acetato de sodio (4,3 mg: 1 g MCH) durante una hora.

Se desarrolló el análisis estadístico utilizando el software de programación Python, en el cual tenemos en cuenta los datos de la Tabla 5. Respecto al diseño experimental se tuvieron en cuenta los factores como datos enteros (int64) y las variables de respuestas como datos con decimales (float64), en este caso se tomaron en cuentas las variables “Pcant\_AH\_mg\_L” para el análisis de ANOVA, y “Mean\_area\_mAU” son áreas bajo la curva para la identificación de AH presente en el extracto obtenido en la digestión enzimática, como se puede evidenciar en la Tabla 6, donde el tiempo de reacción en los diferentes experimentos, indicó una media de  $20 \pm 8,66$  horas, las

mediciones del área bajo la curva, expresadas en unidades de absorbancia (mAU) arrojaron un promedio de  $5,84 \pm 0,88$ . Los valores de ABC oscilaron entre 4,82 y 6,95 unidades.

Por último, la concentración AH (mg/L), tiene un promedio de 12,36 mg/L, con una desviación estándar de alrededor de 1,88 mg/L. Los valores de concentración registrados estuvieron comprendidos entre 10,21 mg/L y 14,72 mg/L.

**Tabla 5**

*Datos de DE en Python*

#	Variables	Conteo nulo	Tipo de dato
0	Experimento	9 non-null	int64
1	Temperatura (°C)	9 non-null	int64
2	F1_Concentración_Papaina_mg	9 non-null	int64
3	F12_Tiempo_h	9 non-null	int64
4	Mean_area_mAU	9 non-null	float64
5	Pcant_AH_mg_L	9 non-null	float64

**Tabla 6**

*Datos del diseño experimental del AH*

	Temperatura (°C)	F1_Concentración_Papaina_mg	F2_Tiempo_h	Mean_area_mAU	Pcant_AH_mg_L
<b>Conteo</b>	9	9	9	9	9
<b>Media</b>	60	20	16	5,84	12,36
<b>Desviación estándar</b>	0	8,66	6,92	0,88	1,88
<b>min</b>	60	10	8	4,82	10,21
<b>25%</b>	60	10	8	4,85	10,29
<b>50%</b>	60	20	16	5,7	12,09
<b>75%</b>	60	30	24	6,84	14,48
<b>max</b>	60	30	24	6,95	14,72

El análisis de varianza se realizó con una confianza del 95%, revela que la variable A (Papaina) tiene la mayor significancia, con un valor-P de 0,00, lo que indica una influencia significativa en

la variable AH. El coeficiente de determinación (R-cuadrada) es del 96,71%, lo que sugiere que el modelo explica casi la totalidad de la variabilidad de los datos en AH con alta confianza

**Tabla 7**

*ANOVA por TUKEY*

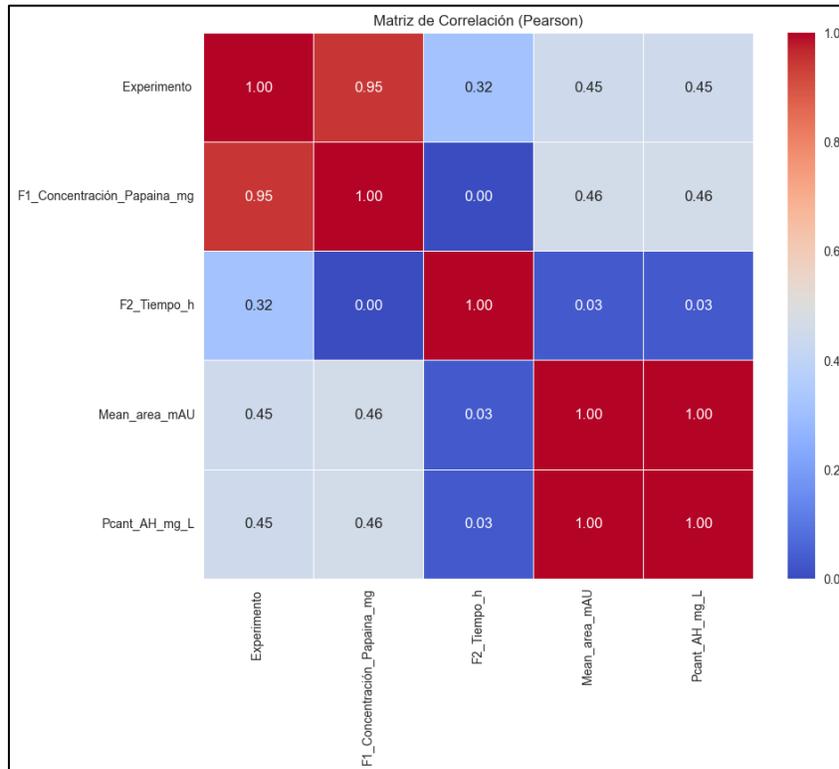
<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A: Papaína	17,98	1	17,98	113,5	0
B: Tiempo	0,09	1	0,09	0,63	0,43
AA	66,37	1	66,37	419,03	0
AB	0,17	1	0,17	1,12	0,3
BB	0,08	1	0,08	0,54	0,47
bloques	3,69	2	1,84	11,66	0
Error total	3,01	19	0,15		
Total (corr.)	91,42	26			

Por lo anteriormente mencionado, la concentración de papaína no se ve afectada al variar en los rangos 10-30 mg. Esto puede ocurrir, ya que una concentración moderada de papaína es crucial para descomponer proteínas que pueden estar unidas al AH, liberando y aumentando su pureza, a una concentración media se asegura una actividad enzimática efectiva para descomponer las proteínas asociadas con el AH, sin degradar excesivamente al componente de interés (Chee et al., 2023)

Por esta razón, se recomienda usar una concentración de papaína  $\leq 20$  mg: g MCH, para preservar la estructura del AH al evitar una degradación directa, por esta razón se evidencia en los resultados, que se alcanza un punto máximo de rendimiento, y que por más adición de enzima, tiende a disminuir el rendimiento final, como se indica en la **Figura 8**, la cual corresponda a una matriz de correlación de los parámetros del diseño experimental, en la cual se puede observar la influencia o relación directa de una variable con otra, en una escala de 0 (siendo la correlación o influencia más baja) a 1 (correlación o influencia máxima).

**Figura 8**

*Matriz de correlación de parámetros del DE*



En general, una elevación alta se muestra con colores intensos como rojo o azul oscuro, indicando una fuerte relación positiva (cerca de +1) o negativa (cerca de -1) entre las variables. Por otro lado, una valoración baja o nula se representa con colores más claros como naranja o blanco, sugiriendo una relación cercana a 0, lo que implica que las variables están débilmente relacionadas o no tienen alguna relación. Esta elección de colores facilita la identificación rápida de patrones: los colores intensos señalan relaciones más fuertes, mientras que los colores más claros indican relaciones débiles o ausencia de tensión (Lorenzo Seva & Ferrando, 2021).

Adicional a lo anterior, se puede comparar la variable de respuesta “AH (Pcant\_AH\_mg\_L)” respecto a la variable “Tiempo (F2\_Tiempo\_h)” en el cual presenta una correlación baja en sus datos de 0,03, llegando a cero. De la misma manera, lo podríamos comparar con la concentración

de papaína (F1\_Concentración\_Papaina\_mg) en la cual presenta una correlación con sus datos de 0,46.

La calificación entre Pcant\_AH\_mg\_L y F2\_Tiempo\_h es baja, con un coeficiente de  $r = 0.03$  cercano a cero, lo que indica una relación lineal muy débil entre la cantidad de AH y el tiempo transcurrido. Según (Lorenzo Seva & Ferrando, 2021), “La evaluación entre variables es baja en términos estadísticos, cuando los datos exhiben poca relación lineal entre sí, el coeficiente de evaluación, como el coeficiente de Pearson, será cercano a cero, indicando una relación débil entre las variables. Esta baja valoración implica que una variable no puede predecir de manera confiable los valores de la otra utilizando una relación lineal simple”.

Por otro lado, el valor entre Pcant\_AH\_mg\_L y F1\_Concentración\_Papaina\_mg es de compensación media, con un  $r = 0,46$  positivo. Este valor indica que aumenta la concentración de papaína, la concentración de AH tiende a incrementarse, lo cual se refleja con un contorno rojo en la barra de mapeo. Sin embargo, un  $r = 0,46$  se considera una compensación media, ya que una compensación alta se definiría con un  $r = 0,9$  o 1. Un  $r = 0$  o 0,5 sugiere una compensación moderada, lo que significa que, aunque hay significancia entre las variables, se necesitarían datos más ajustados para una compensación fuerte.

Con respecto a lo mencionado, se realizó una prueba de múltiples rangos para AH por Papaína en la que se utilizó el método de Tukey HSD con un 95%. Los grupos de concentraciones mostraron un comportamiento homogéneo, dando lugar a un contenido de AH de  $12,36 \text{ mg/g MCH} \pm 1,88$  con una concentración de 20 mg de papaína a  $60^\circ\text{C}$ .

En relación con una concentración de 20 mg de papaína, se observará una diferencia significativa en los grupos de 20-30 mg de papaína. Los resultados óptimos de AH se obtuvieron a  $60^\circ\text{C}$  con una concentración de 20 mg; el resultado obtenido presenta similitud con la investigación de Alparce et al., (2018), donde al variar el tiempo de operación, se obtuvo la mayor cantidad de AH de  $5,52 \text{ mg/g MCH}$  a  $60^\circ\text{C}$  en una concentración de papaína igual al de este estudio de 20 mg/g MCH. Sin embargo, su resultado resulta ser menor al de esta investigación. Üргеová y

Vulganová, (2016) alcanzaron su punto óptimo de AH en condiciones de trabajo de operación con papaína a 3152 USP U/g MCH, temperatura de 60°C y pH 7,5, lo que proporcionó una cantidad de ácido hialurónico de 39,02 mg/g MS. Sin embargo, según los resultados del trabajo de (Ürgeová & Vulganová, 2016b), por más que se incremente la cantidad de papaína, no se obtendrá una mayor cantidad de AH, como se menciona en la **Tabla 8**.

**Tabla 8**

*Efecto de las cantidades de enzima en el contenido de ácido hialurónico*

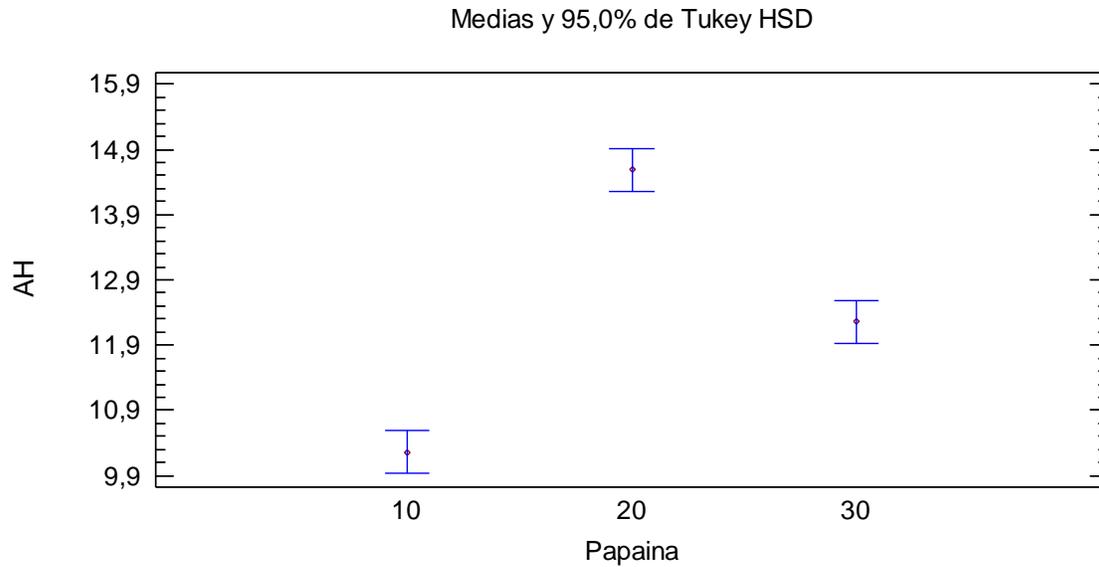
	Enzima y su actividad	Ácido Hialuronico [mg/g DM]
Pepsina	80 FIP-U/g	38,79
	40 FIP-U/g	29,7
Tripsina	17 U/g	38,45
	33 U/g	40,13
	50 U/g	44,83
Papaína	1576 USP U/g	34,76
	3152 USP U/g	39,02
	9457 USP U/g	38,45
	15762 USP U/g	34,42

Fuente: (Ürgeová & Vulganová, 2016b)

En relación con la idea anterior, la combinación de papaína y bromelaína como enzimas genera una mayor cantidad de ácido hialuronato en condiciones de 60°C y pH 8, obteniendo un rendimiento del 6,692 % ± 0,729 con una relación de enzimas 1:2, según lo mencionado en los resultados de (Leong et al., 2023b).

### Grafica 3

Ajuste de medias de AH por Papaína



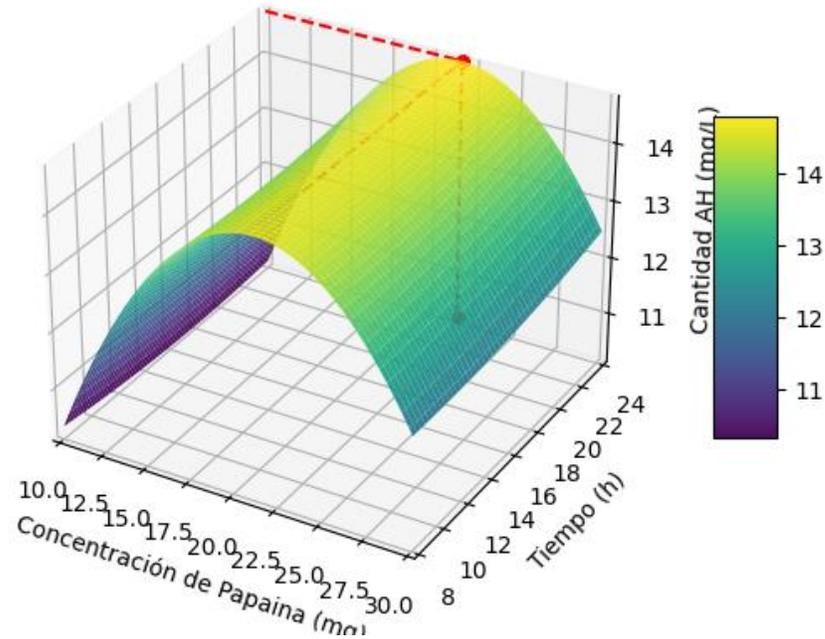
Por otra parte, por medio de un ajuste de parametros se logró obtener la **Ecuación 2**. del modelo matemático, la cual se utilizó para encontrar el punto óptimo de AH en la gráfica de superficie de respuesta que se indica en la **Grafica 43**. El punto óptimo del AH a una concentración de *papaína* 20 mg que se da a una media LS de  $14,58 \pm 0,18$  mg/g MCH.

*Ecuación 2 Modelo matemático de ajuste para AH*

$$AH = 0,0174074 + 1,40606 * Papaina - 0,0805556 * Tiempo - 0,0332611 * Papaina^2 + 0,00152083 * Papaina * Tiempo + 0,00185764 * Tiempo^2$$

**Grafica 4**

*Superficie de respuesta para cantidad de AH*



En la gráfica de superficie de respuesta que se evidencia en la **Grafica 44**, se puede empezar a interactuar con diversos valores en los factores que dan respuesta a la variable de AH, en este caso, se da un punto máximo medio LS de AH a  $14,58 \pm 0,18$  mg/g MCH, donde la concentración de *papaína* en una variable importante para la obtención óptima de AH como anteriormente se menciona. Sin embargo, el tiempo llega a ser una variable sin significancia. En los resultados no tiene una variación del contenido de AH respecto al tiempo de 3,5 y 8 horas propuestos en la investigación de (Ürgeová & Vulganová, 2016b).

Sin embargo, menciona que las condiciones óptimas para la hidrólisis incluyen una cantidad de *pepsina* de 80 unidades FIP/ g MCH con un pH de 3 y 40 °C; un pH de 8 y 37 °C con una cantidad de enzima de 50 U/g MCH utilizando *tripsina*; y un pH de 7,5 a una temperatura de 60 °C con una cantidad de enzima de 3152 unidades USP/g MCH utilizando *papaína* para obtener de 30-40 contenido de AH mg/g MCH (Ürgeová & Vulganová, 2016b).

### 2.3. Cumplimiento del tercer objetivo

Respecto al desarrollo del tercer objetivo, se realizó una caracterización fisicoquímica del extracto de AH, donde se determinaron parámetros tales como: pH, contenido de agua y un análisis comparativo del espectro obtenido de cromatografía líquida HPLC a condiciones anteriormente descritas.

#### 2.3.1. Caracterización fisicoquímica del AH extraído de la MCH

Posteriormente la evaluación fisicoquímica del extracto de AH que se obtuvo en la digestión enzimática se realizó una caracterización fisicoquímica descrita en la **Tabla 9**.

**Tabla 9**

*Tabla de caracterización fisicoquímica del extracto de AH*

<b>Factor</b>	<b>Instrumento</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>Coefficiente de variación</b>	<b>Unidades</b>
pH	Potenciómetro	6,5	0,56	0,08	U pH
Actividad acuosa	Balanza de humedad	0,73	0,03	0,04	%
Densidad	Balanza analítica	0,84	0,08	0,1	g/cm <sup>3</sup>

Se obtuvo un valor promedio de pH de  $6,5 \pm 0,56$ . Es esencial controlar el pH entre 4,5 a 9,5 para que el AH reticulado puede formar una estructura tridimensional que se expande y afecta la liberación de ingredientes activos como moléculas antibacterianas, sustancias antiinflamatorias, proteínas y anticuerpos evitando la hinchazón como lo menciona (Sciabica et al., 2021). Los resultados obtenidos por (Saranraj & Naidu, 2013) son iguales a los obtenidos, donde el autor obtiene una caracterización de su pH  $6,5 \pm 1,0$  soluble a un 1% con color blanco y polvo fino. Según (Rodriguez et al., 2022) luego de realizar experimentos afirma que el pH óptimo para el AH es de 6,7, valor el cual respalda los resultados obtenidos, ya que se encuentran dentro del rango de pH expresado en las referencias bibliográficas

### 2.3.2. Análisis cromatográfico HPLC

Se llevaron las muestras de extracto de AH al cromatógrafo líquido HPLC Thermo Scientific Ultimate 3000 RS a condiciones indicadas anteriormente en la **Tabla 2** donde se obtuvieron los cromatogramas de la solución patrón de AH y de las 27 muestras del diseño factorial, con sus respectivas ABC, de las cuales se determina el contenido de AH presente en cada muestra, como se observa en la **Tabla 10**.

**Tabla 10**

*Resultados de cromatografía líquida de muestra de AH*

Muestra	Área (mAU)	Concentración (mg/L)
<i>Estándar de ácido hialurónico</i>	47,22	100
1	26,01	55,09
2	5,3	11,22
3	4,88	10,32
4	7,14	15,12
5	6,96	14,74
6	7,05	14,93
7	6,16	13,05
8	6,16	13,04
9	6,33	13,4
10	4,86	10,3
11	4,79	10,15
12	4,84	10,24
13	6,87	14,54
14	6,9	14,62
15	6,62	14,01
16	5,54	11,74
17	5,36	11,36
18	5,72	12,11
19	4,78	10,13
20	4,49	9,5
21	4,86	10,28
22	6,85	14,51
23	6,66	14,1
24	6,95	14,71

25	5,39	11,41
26	5,61	11,88
27	5,83	12,35

Teniendo en cuenta la formulación del problema planteado al inicio de la investigación, se puede concluir que el factor concentración de papaína influye directamente sobre la variable de respuesta Rendimiento AH. Mientras que con ayuda del análisis estadístico realizado y descrito anteriormente, se halló que la variación del tiempo no es significativa para el rendimiento de AH, a diferencia de la concentración de papaína, el cual presenta una correlación fuerte en la variable de respuesta, por lo tanto, es estadísticamente significativa sobre el rendimiento de AH.

## 2.4. Cumplimiento del cuarto objetivo

### 2.4.1. Formulación de sérum

Respecto al desarrollo del cuarto objetivo, se ejecutó el diseño de mezclas planteado en la metodología, para la elaboración de un sérum facial con AH con ayuda el software estadístico Statgraphics 19R Centurión, donde se realizaron quince corridas de mezclas variando composiciones de AH, agua destilada y glicerina, con composición de ácido ascórbico fija.

Se realizó la determinación de capacidad antioxidante de las 15 mezclas de sérum facial con la capacidad antioxidante como variable de respuesta, como se indica en la **Tabla 11** usando el método DPPH, descrito anteriormente, ya que es un enfoque popular, rápido, fácil y asequible para la medición de las propiedades antioxidantes que incluye el uso de los radicales libres utilizados para evaluar el potencial de las sustancias para servir como proveedores de hidrógeno o eliminadores de radicales libres (FRS).

**Tabla 11**

*Datos del diseño de mezclas*

MEZCLA	AH (%)	GLICERINA (%)	AGUA (%)	Á. ASCÓRBICO (%)	CAP. ANTIOX. (AA %)
1	1	18	76	5	62
2	4	18	73	5	75

<b>3</b>	<b>4</b>	<b>21</b>	<b>70</b>	<b>5</b>	<b>78</b>
4	1	21	73	5	68
5	1,75	18,75	74,5	5	68
6	3,25	18,75	73	5	71
7	3,25	20,25	71,5	5	73
8	1,75	20,25	73	5	66
9	2,5	18	74,5	5	68
10	1	19,5	74,5	5	64
11	4	19,5	71,5	5	76
12	2,5	19,5	73	5	70
13	2,5	21	71,5	5	68
14	2,5	19,5	73	5	70
15	1	18	76	5	65

Se obtuvo un promedio de AA % de  $69,78 \pm 4,53$ , y la mezcla con mayor resultado en la variable de respuesta (% de capacidad antioxidante) según la **Ecuación 1** es la mezcla del ensayo número tres, con 78,00 % AA, la cual presenta un porcentaje mayor respecto a la investigación de (Müller Sepúlveda, 2008) donde se evaluó la AA del AH y condroitín-6-sulfato y líquidos sinoviales en la oxidación de tioles microsómicos donde obtuvieron un 45,8 % AA. Cabe resaltar que no se encontró referentes bibliográficos con estudios de la AA del AH en aplicaciones cosméticas.

Se decidió determinar la capacidad antioxidante en las diferentes mezclas, debido a que se pretende realizar una aplicación del AH en productos cosméticos, los cuales son valorados por tener propiedades antioxidantes, ayudando a neutralizar los radicales libres, las cuales son moléculas altamente reactivas que podrían afectar las células del tejido cutáneo mediante un proceso de estrés oxidativo (Hoang et al., 2021) y previenen el daño causado por la exposición a la radiación ultravioleta (UV) del sol, los cuales pueden aumentar la producción de radicales libres en el tejido cutáneo, provocando quemaduras, daño celular y aumento de riesgo del cáncer de piel (Jesus et al., 2023)

#### **2.4.2. Análisis estadístico de diseño de mezclas**

El análisis estadístico revela que el modelo de regresión es significativo, con un coeficiente de determinación  $R^2$  de 92,51% y un  $R^2$  ajustado de 88,34%. Estos resultados indican que el modelo

explica aproximadamente el 92,51% de la variabilidad en la variable de interés, lo cual sugiere que las variables independientes tienen un impacto significativo en la variable dependiente.

Al examinar los componentes del análisis de varianza (ANOVA), se evidencia que, aunque el modelo en su conjunto es significativo (valor  $p < 0,05$ ), no todos los términos individuales alcanzan la significancia estadística convencional. Por ejemplo, los términos lineales y cuadráticos no son estadísticamente significativos (valor  $p > 0,05$ ), lo que sugiere que podrían ser excluidos del modelo final.

El  $R^2$  ajustado del 88,34% toma en consideración el número de predictores en el modelo, ofreciendo una evaluación más realista de la calidad del ajuste. A pesar de la inclusión de múltiples variables, el modelo sigue siendo sólido y capaz de generalizar bien a datos no observados.

Teniendo los resultados de AA %, se procede a realizar el ANOVA del diseño de mezclas, obteniendo los resultados indicados en la **Tabla 12**.

**Tabla 12**

*ANOVA para diseño de mezclas.*

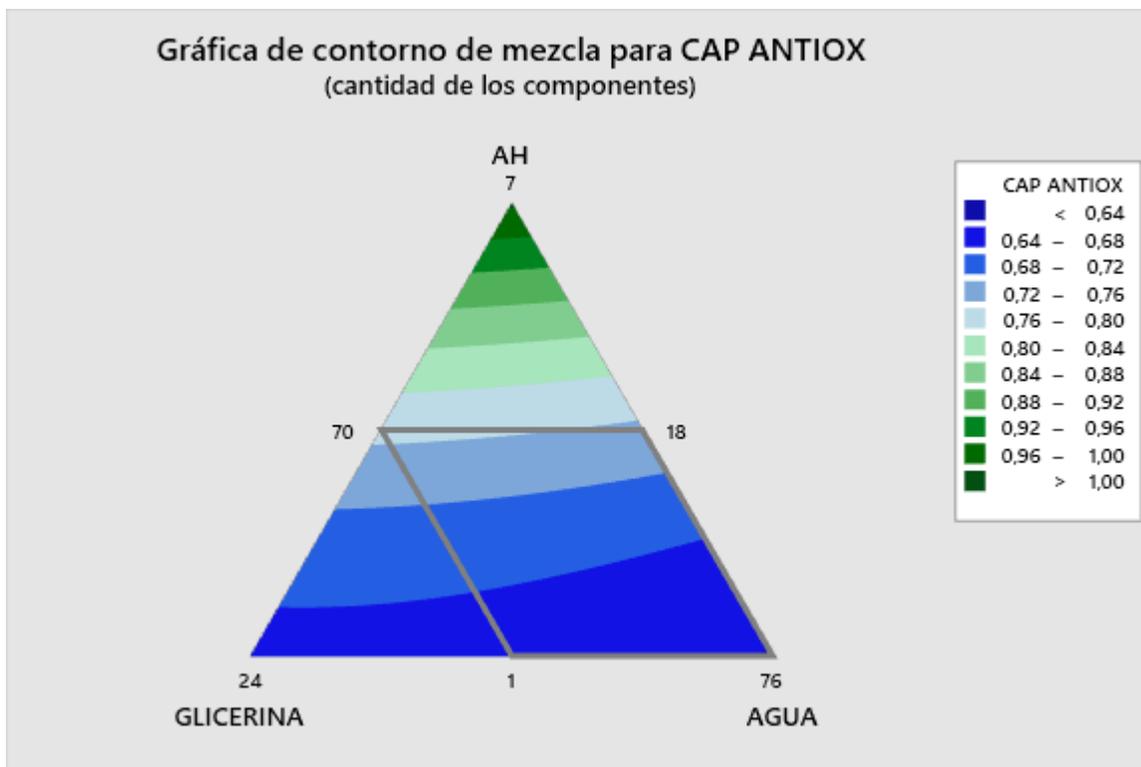
Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Regresión	5	266,17	266,17	53,23	22,22	0
Lineal	2	257,9	9,09	4,54	1,9	0,2
Cuadrático	3	8,26	8,26	2,75	1,15	0,38
AH*GLICERINA	1	0,02	3,48	3,48	1,45	0,25
AH*AGUA	1	8,06	7,99	7,99	3,34	0,1
GLICERINA*AGUA	1	0,17	0,17	0,17	0,07	0,79

Error residual	9	21,56	21,56	2,39		
Falta de ajuste	7	17,06	17,06	2,43	1,08	0,55
Error puro	2	4,5	4,5	2,25		
Total	14	287,73				

Adicionalmente, se generó la gráfica de contorno de mezcla para AA para evidenciar el punto óptimo de las concentraciones de los componentes respecto a la AA, indicando una mayor AA en la zona color azul celeste, a una composición aproximada de 72% agua, 18% glicerina y 1% AH, como se evidencia en la **Grafica 5**.

### Grafica 5

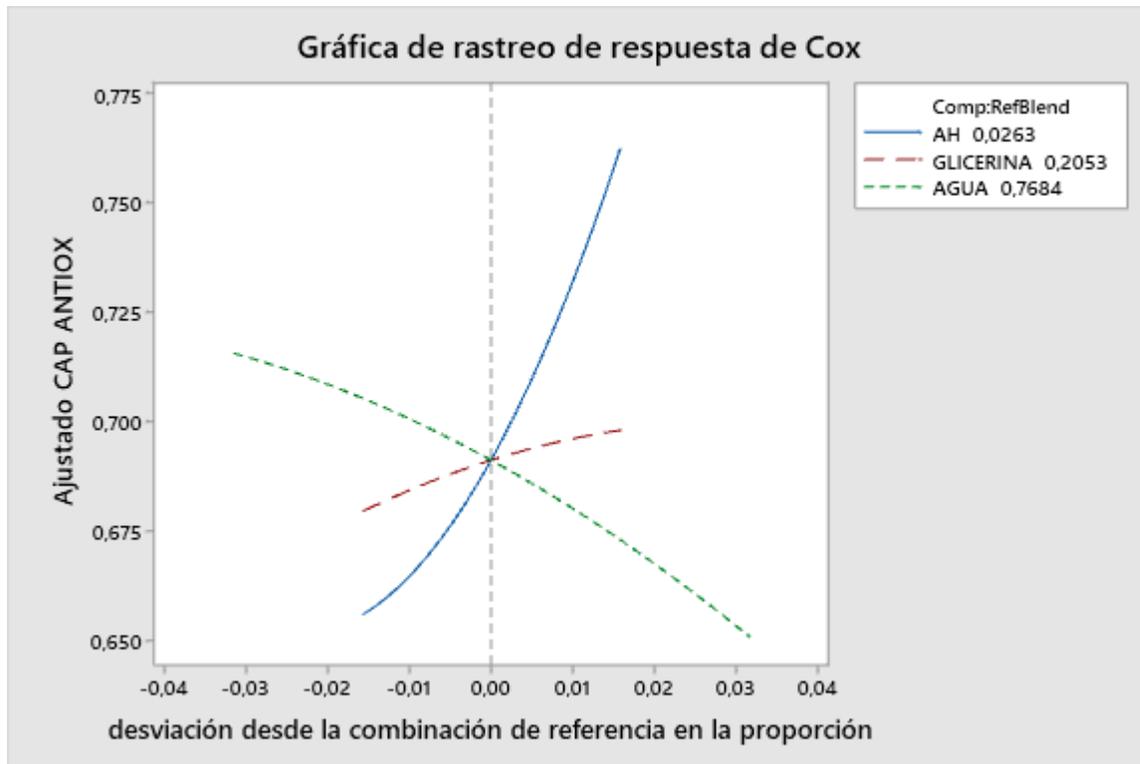
*Grafica de contorno de mezcla*



Por último, se generó una gráfica de rastreo de respuesta según la AA, donde se puede evidenciar que la variable con mayor correlación con la variable de respuesta es el AH, indicando también que es directamente proporcional a la AA %, como se evidencia en la **Gráfica 4**.

### Gráfica 6

Gráfica de rastreo de respuesta.



#### 2.4.3. Análisis de resultados (NTC 4833, 2012)

Se realizó un análisis de parámetros fisicoquímicos descritos en la NTC 4833, 2012 la cual describe los parámetros para que un producto cosmético sea de bajo riesgo microbiológico, para lo cual se realizaron mediciones de pH con el método anteriormente descrito, se tuvo en cuenta el contenido de agua de la mezcla del sérum, una temperatura de llenado  $\geq 60^{\circ}\text{C}$  en el proceso de envasado final y la adición de productos ya sea de base solvente o algún producto antioxidante, donde teniendo en cuenta los anteriores parámetros se eligió añadir ácido ascórbico por su capacidad antioxidante, y se propuso una formulación de un producto cosmético de bajo riesgo microbiológico tipo sérum facial, obteniendo una composición y parámetros fisicoquímicos descritos en la **Tabla 13**.

**Tabla 13***Composición sérum cosmético basado en NTC 4833, 2012*

<b>Factor</b>	<b>Composición (%)</b>	<b>Función</b>
AH	5	Contribuye a la hidratación del tejido cutáneo, así como un aumento en la elasticidad cutánea y la luminosidad después del tratamiento con el suero facial que contiene AH (Juncan et al., 2021).
Glicerina	15	Es un ingrediente suave, no irritante e hidrata profundamente el tejido cutáneo, lo cual facilita su aplicación en diversos tipos de piel. Adicionalmente es compatible con variedad de ingredientes cosméticos, lo que facilita su incorporación en diversas formulaciones (Becker et al., 2019).
Ácido ascórbico	15	Proporciona propiedades antioxidantes, estimula la producción de colágeno y contribuye a la iluminación de la piel, reduciendo la apariencia de decoloraciones en el tejido cutáneo (Ravetti et al., 2019).
Agua destilada	65	Es esencial en la formulación de un producto cosmético gracias a su capacidad de hidratación cutánea, solubilizar otros ingredientes y mejorar significativamente la textura del producto final (Aguiar et al., 2022).

En esta investigación, se propone la formulación de un producto cosmético de bajo riesgo microbiológico teniendo en cuenta los parámetros fisicoquímicos descritos en la NTC 4833, 2012, donde se tendría como principal componente activo el AH, en una mezcla de glicerina, agua destilada y ácido ascórbico que funciona como agente antioxidante, característica también descrita en la norma técnica, a una temperatura de llenado  $\geq 75^\circ \text{C}$  y con un resultado de pH entre 3 y 10.

### **3. Conclusiones**

El análisis detallado de un proceso experimental para extraer AH de MCH mediante hidrólisis enzimática con papaína. Se observa una consistencia y precisión en las mediciones fisicoquímicas de las MCH, con un pH promedio de  $7,97 \pm 0,59$  y una moderada variabilidad. La humedad exhibe una mayor dispersión, mientras que la densidad muestra una mínima variabilidad. Sin embargo, el contenido de ceniza es notablemente elevado.

En cuanto a la digestión enzimática y el análisis estadístico, se realizaron múltiples experimentos a una temperatura constante de  $60^{\circ}\text{C}$  y con concentraciones variables de papaína. La concentración de papaína mostró la mayor significancia en la producción de AH, mientras que el tiempo de reacción no pareció ser una variable significativa. La concentración promedio de AH obtenida fue de aproximadamente  $12,37 \pm 1,88$  mg/L en el diseño experimental.

El análisis cromatográfico corroboró la presencia de AH en los extractos obtenidos, mientras que la caracterización fisicoquímica del extracto de AH mostró un pH promedio de  $6,5 \pm 0,56$ , indicando coherencia con el rango óptimo para el AH. Además, se obtuvo una Media LS de  $14,58 \pm 0,18$  de AH respecto a una concentración de 20 mg de papaína dando lugar a una diferencia significativa y siendo heterogéneo respecto a los grupos analizados el DE.

Además, se utilizó un diseño de mezclas para la elaboración de un sérum facial con AH, donde se encontró que la mezcla con mayor capacidad antioxidante fue el número tres, con una composición específica.

Se destaca la metodología convencional para la higienización de las CH, aunque no se realizó un análisis microbiológico en este estudio. Se compararon los métodos de separación de MCH y se destacó el rendimiento obtenido en este estudio.

El proceso experimental demostró la viabilidad de extraer AH de MCH mediante hidrólisis enzimática, con resultados consistentes en la caracterización fisicoquímica y el análisis cromatográfico. Los factores como la concentración de papaína mostraron una influencia significativa en la producción de AH, mientras que el tiempo de reacción no tuvo un efecto pronunciado.

#### **4. Recomendaciones**

Se sugiere realizar pruebas detalladas microbiológicas después de hacer la respectiva higienización de las CH para determinar si existe presencia de microorganismos patógenos.

Es importante promover la investigación sobre compuestos activos provenientes de residuos orgánicos como el AH, ya que contribuye al avance en el campo de la producción industrial de productos de interés en los diferentes campos investigativos.

Profundizar en la investigación sobre metodologías de purificación de AH para una futura comercialización de este componente, en áreas de alta demanda, como la industria cosmética o farmacéutica.

Tener en cuenta rangos de tiempos en minutos para evidenciar si el factor tiempo sigue siendo insignificante respecto a la variable de respuesta, y respecto al otro factor, concentración de papaína.

A pesar de los resultados de referentes bibliográficos que expresan que la mejor temperatura de hidrólisis enzimática con papaína para la obtención de AH es 60°C, se podría establecer la temperatura como una variable de estudio, y no dejarla fija para evidenciar el efecto sobre la variable de respuesta.

## Referencias

- Aditya, S., Stephen, J., & Radhakrishnan, M. (2021). Utilization of eggshell waste in calcium-fortified foods and other industrial applications: A review. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 115, pp. 422–432). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.047>
- Aguiar, J. B., Martins, A. M., Almeida, C., Ribeiro, H. M., & Marto, J. (2022). Water sustainability: A waterless life cycle for cosmetic products. In *Sustainable Production and Consumption* (Vol. 32, pp. 35–51). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.spc.2022.04.008>
- Alparce, N., Kumar Anal, A., & Noomhorm, A. (2018a). *Sequential Extraction of Hyaluronic Acid and Collagen from Chicken Eggshell Membrane Lactobacillus plantarum fermentation project View project Tropical fermentation View project*.
- Alparce, N., Kumar Anal, A., & Noomhorm, A. (2018b). *Sequential Extraction of Hyaluronic Acid and Collagen from Chicken Eggshell Membrane Lactobacillus plantarum fermentation project View project Tropical fermentation View project*. <https://www.researchgate.net/publication/352815078>
- Baliyan, S., Mukherjee, R., Priyadarshini, A., Vibhuti, A., Gupta, A., Pandey, R. P., & Chang, C. M. (2022). Determination of Antioxidants by DPPH Radical Scavenging Activity and Quantitative Phytochemical Analysis of *Ficus religiosa*. *Molecules*, 27(4). <https://doi.org/10.3390/molecules27041326>
- Bayer, I. S. (2020). Hyaluronic acid and controlled release: A review. *Molecules*, 25(11). <https://doi.org/10.3390/molecules25112649>
- Becker, L. C., Bergfeld, W. F., Belsito, D. V., Hill, R. A., Klaassen, C. D., Liebler, D. C., Marks, J. G., Shank, R. C., Slaga, T. J., Snyder, P. W., Gill, L. J., & Heldreth, B. (2019). Safety Assessment of Glycerin as Used in Cosmetics. *International Journal of Toxicology*, 38(3\_suppl), 6S-22S. <https://doi.org/10.1177/1091581819883820>
- 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 ISSN 2027-4297*, 12(2), 3. <https://doi.org/10.24188/recia.v12.n2.2020.776>

- Bhatia, S. (2018). Introduction to enzymes and their applications. *Introduction to Pharmaceutical Biotechnology, Volume 2*, 1-1-1–29. <https://doi.org/10.1088/978-0-7503-1302-5ch1>
- BRF Ingredients. (2022). *Los Beneficios de la Hidrólisis Enzimática en la Formulación de Alimentos de Alto Rendimiento*. <https://www.brfingredients.com/es/blog/posts/los-beneficios-de-la-hidrolisis-enzimatica-en-la-formulacion-de-alimentos-de-alto-rendimiento/>
- Cabrera Báez, Á. C., Uribe Medina, A. F., Agudelo Valencia, M. L., Riomañana Trigueros, O. F., Colmenares Baena, R., Peña Marín, Y., Londoño Aguirre, D. I., & Sánchez Triana, M. P. (2017). *IDENTIFICACIÓN Y MEDICIÓN DE BRECHAS DE CAPITAL HUMANO PARA EL SECTOR DE COSMÉTICOS, ASEO Y ABSORBENTES*.
- Çağlar, E. Ş., Üstündağ Okur, N., & Karasulu, H. Y. (2022). Development and validation of an HPLC method for the determination of hyaluronic acid active substance in pharmaceutical formulations. *Journal of Research in Pharmacy*, 26(1), 112–122. <https://doi.org/10.29228/jrp.108>
- Callejas Quijada, G., Campos Lozada, G., Escobar Chávez, J. J., Pérez Marroquín, X. A., & Aguirre Álvarez, G. (2023). *Hyaluronic Acid — Extraction Methods, Sources and Applications*. 1–25. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/polym15163473>
- Campos, T. G. (2015a). *EXTRACCIÓN Y APLICACIONES ALIMENTARIAS DE MEMBRANAS DE CÁSCARAS DE HUEVO*. Universidad de Oviedo.
- Campos, T. G. (2015b). *EXTRACCIÓN Y APLICACIONES ALIMENTARIAS DE MEMBRANAS DE CÁSCARAS DE HUEVO* [Trabajo fin de Master]. Universidad de Oviedo.
- Chávez Feijoo, S. A. (2021a). *Diseño de un sistema de extracción de ácido hialurónico y colágeno a partir de membranas de cáscaras de huevo para aplicaciones cosméticas*.
- Chávez Feijoo, S. A. (2021b). *Diseño de un sistema de extracción de ácido hialurónico y colágeno a partir de membranas de cáscaras de huevo para aplicaciones cosméticas*.
- Chee, S. J., Wong, R.-F., Cheng, K.-K., Othman, Z., & Leong, H.-Y. (2023). Hyaluronic Acid Extraction from Eggshell Membrane with Papain and Bromelain. In *Bioprocessing and Biomass Technology* (Vol. 2, Issue 2).

- Draelos, Z. D., Diaz, I., Namkoong, J., Wu, J., & Boyd, T. (2021). Efficacy Evaluation of a Topical Hyaluronic Acid Serum in Facial Photoaging. *Dermatology and Therapy*, 11(4), 1385–1394. <https://doi.org/10.1007/s13555-021-00566-0>
- EduMedia. (2024). *Hidrólisis Enzimática*. <https://www.edumedia.com/es/media/164-hidrolisis-enzimatica>
- FENAVI. (2022). *El huevo en Colombia*.
- Flores, J., Caballero, C., & Moreira, M. (2008). Una interpretación aproximativa del concepto de Hidrólisis en estructuras peptídicas en un Curso de Bioquímica del IPC en el contexto de la Teoría de los Campos Conceptuales de Vergnaud. *Revista de Investigación Versión ISSN 1010-2914*, 32, 135–159.
- Food News Latam. (2018). *¿Para qué se utiliza la papaina?* <https://www.foodnewslatam.com/paises/89-peru/4749-¿para-qué-se-utiliza-lapapaina.html>
- Godoy, R. C. B., Waszczyński, N., Santana, F. A., e Silva, S. de O., de Oliveira, L. A., & dos Santos, G. G. (2016). Physico-chemical characterization of banana varieties resistant to black leaf streak disease for industrial purposes. *Ciencia Rural*, 46(9), 1514–1520. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20150905>
- Gole, V. C., Chousalkar, K. K., Roberts, J. R., Sexton, M., May, D., Tan, J., & Kiermeier, A. (2014). Effect of egg washing and correlation between eggshell characteristics and egg penetration by various *Salmonella typhimurium* strains. *PLoS ONE*, 9(3), 2. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090987>
- Goyal, A., & Shekhar Tailor, C. (2014). Antioxidant Activity by DPPH Radical Scavenging Method of *Ageratum conyzoides* Linn. Leaves. *Orient*, 1(4), 244–249.
- Guo, X., Zhang, F., Peng, Q., Xu, S., Lei, X., Evans, D. G., & Duan, X. (2011). Layered double hydroxide/eggshell membrane: An inorganic biocomposite membrane as an efficient adsorbent for Cr (VI) removal. *Chemical Engineering Journal*, 166(1), 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2010.10.010>

- Han, C., Chen, Y., Shi, L., Chen, H., Li, L., Ning, Z., Zeng, D., & Wang, D. (2023). Advances in eggshell membrane separation and solubilization technologies. In *Frontiers in Veterinary Science* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1116126>
- Harmita, H., Hayun, H., & Geofani, M. H. (2020). Quantification of hyaluronic acid and methylsulfonylmethane in dietary supplements. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 12(Special Issue 1), 143–148. <https://doi.org/10.22159/ijap.2020.v12s1.FF032>
- Hoang, H. T., Moon, J. Y., & Lee, Y. C. (2021). Natural antioxidants from plant extracts in skincare cosmetics: Recent applications, challenges and perspectives. In *Cosmetics* (Vol. 8, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cosmetics8040106>
- Instituto de Estudios del Huevo. (2023). *Estructura Del Huevo*. [https://www.institutohuevo.com/estructura\\_huevo/](https://www.institutohuevo.com/estructura_huevo/).
- Jesus, A., Mota, S., Torres, A., Cruz, M. T., Sousa, E., Almeida, I. F., & Cidade, H. (2023). Antioxidants in Sunscreens: Which and What For? *Antioxidants*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/antiox12010138>
- Juncan, A. M., Moisă, D. G., Santini, A., Morgovan, C., Rus, L. L., Vonica-țincu, A. L., & Loghin, F. (2021). Advantages of hyaluronic acid and its combination with other bioactive ingredients in cosmeceuticals. *Molecules*, 26(15). <https://doi.org/10.3390/molecules26154429>
- Khanmohammadi, M., Khoshfetrat, A. B., Eskandarnezhad, S., Sani, N., & Ebrahimi, S. (2014a). Sequential optimization strategy for hyaluronic acid extraction from eggshell and its partial characterization. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 20(6), 4371–4376. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2014.02.001>
- Khanmohammadi, M., Khoshfetrat, A. B., Eskandarnezhad, S., Sani, N., & Ebrahimi, S. (2014b). Sequential optimization strategy for hyaluronic acid extraction from eggshell and its partial characterization. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 20(6), 4371–4376. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2014.02.001>

- La Nuez García, M., & Aguirre Gonzáles, A. (2018). *PROCEDIMIENTO Y COMPOSICIÓN DE HIDROLIZACIÓN DE MEMBRANA DE CÁSCARA DE HUEVO* (Patent 2 633 062).
- Lago Mendoza, G. (2007). *Cordones umbilicales residuales, nueva fuente de obtención de ácido hialurónico y sus fracciones*. Centro de Histoterapia Placentaria Instituto de Farmacia y Alimentos.
- Leong, H.-Y., Cheng, K.-K., Sim, J.-C., Wong, R.-F., & Othman, N. Z. (2023a). Hyaluronic Acid Extraction from Eggshell Membrane with Papain and Bromelain. *Journal of Bioprocessing and Biomass Technology*, 2(2), 25–28. <https://doi.org/10.11113/bioprocessing.v2n2.30>
- Leong, H.-Y., Cheng, K.-K., Sim, J.-C., Wong, R.-F., & Othman, N. Z. (2023b). Hyaluronic Acid Extraction from Eggshell Membrane with Papain and Bromelain. *Journal of Bioprocessing and Biomass Technology*, 2(2), 25–28. <https://doi.org/10.11113/bioprocessing.v2n2.30>
- Lorenzo Seva, U., & Ferrando, P. J. (2021). Not Positive Definite Correlation Matrices in Exploratory Item Factor Analysis: Causes, Consequences and a Proposed Solution. *Structural Equation Modeling*, 28(1), 138–147. <https://doi.org/10.1080/10705511.2020.1735393>
- Macías Ortega, M., Espinoza, P. C., Suazo, S., Jiménez, A. N., Rubio, F., & Breve, L. (2015). APLICACIÓN CLÍNICA DEL ÁCIDO HIALURÓNICO. *Revista de La Facultad de Ciencias Médicas ISSN 1991-5225*, 1–3.
- Macneil, J. (2001). *METHOD AND APPARATUS FOR SEPARATING A PROTEIN MEMBRANE AND SHELL MATERIAL IN WASTE EGG SHELLS* (Patent US 6,176,376 B1).
- Manturova, N. E., Smirnova, G. O., Stupin, V. A., & Silina, E. V. (2018). The ratio of collagen types I/III as a marker of skin aging and prognosis of aesthetic facial surgery results. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10(10), 2543–2546.
- Márquez Polo, D. J. (2021). *Revisión de diferentes métodos de evaluación de eficacia de productos cosméticos antienvjecimiento*. Universidad de Cartagena.
- Mendoza, N., Chávez, G., & Araya, O. (2022). Membrana de la cáscara de huevo para curación de heridas superficiales en ratones. *Biomédica*. <https://doi.org/10.7705/biomedica.6192>

- Mendoza, R., Aguilera, C., López, O., Pérez, S., & Arias, A. (2016). *CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE PÉPTIDOS OBTENIDOS DE HIDROLIZADOS DE TILAPIA CON BROMELINA Y PAPAÍNA RESUMEN. 1*, 782–788.
- Mensah, R. A., Cook, M. T., Kirton, S. B., Hutter, V., & Chau, D. Y. S. (2023). A drug-incorporated-microparticle-eggshell-membrane-scaffold (DIMES) dressing: A novel biomaterial for localised wound regeneration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 190(May), 258–269. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2023.07.007>
- Monferrer Ballester, A., & Cubero Esquinas, N. (2010). *Método para separar la membrana interna de la cáscara del huevo*.
- Müller Sepúlveda, A. J. (2008). *EFECTO ANTIOXIDANTE DE ÁCIDO HIALURÓNICO, CONDROITÍN SULFATO Y LÍQUIDO SINOVIAL DE ARTICULACIÓN METACARPO FALÁNGICA EQUINA NORMAL, CON DAÑO CRÓNICO Y CON MEMBRANA SINOVIAL CONGESTIVA*. Universidad de Chile.
- Necas, J., Bartosikova, L., Brauner, P., & Kolar, J. (2008). Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. In *Veterinarni Medicina* (Vol. 53, Issue 8).
- Nerdy, N., & Manurung, K. (2018). Spectrophotometric method for antioxidant activity test and total phenolic determination of red dragon fruit leaves and white dragon fruit leaves. *Rasayan Journal of Chemistry*, 11(3), 1183–1192. <https://doi.org/10.31788/RJC.2018.1134018>
- Ono, T., & Wakasugi, N. (1984). Mineral content of quail embryos cultured in mineral-rich and mineral-free conditions. *Poultry Science*, 63(1), 159–166. <https://doi.org/10.3382/ps.0630159>
- Otohinoyi, D. A., Ekpo, O., & Ibraheem, O. (2014). Effect of ambient temperature storage on 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) as a free radical for the evaluation of antioxidant activity. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 8(3), 1262. <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v8i3.39>
- Pérez Gumeta, B., Meza Gordillo, R., Ventura Canseco, L., Enciso Sáenz, S., Abud Archilla, M., Villalobos Maldonado, J., Cruz Rodríguez, R., & Ayora Talavera, T. (2018). OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ÁCIDO HIALURÓNICO DEL HUMOR VÍTREO DE *Oreochromis niloticus*. *AGROproductividad*, 11(6), 128–134.

- Pineda, E. M., Torres Vargas, G. M., & Cepeda Fonseca, H. E. (2023). Physicochemical evaluation of acid whey obtained from doble crema cheese produced in Belén, Boyacá, Colombia. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales*, 10(2), 42–54. <https://doi.org/https://doi.org/10.23850/24220582.5819>
- Pivovarov, O., Kovalova, O., & Koshulko, V. (2022). Disinfection of Marketable Eggs By Plasma-Chemically Activated Aqueous Solutions. *Food Science and Technology*, 16(1), 101–105. <https://doi.org/10.15673/fst.v16i1.2289>
- Ponkham, Walaiporn., Limroongreungrat, Kullaya., & Sangnark, Arpathsra. (2011). Extraction of collagen from hen eggshell membrane by using organic acids. *Thai Journal of Agricultural Science*, 44(5), 354–360.
- Posso Vergara, A. R. (2020). *Método de Reutilización de la Cascara de Huevo*. Universidad Católica de Pereira.
- Propaís. (2014). *Sector de Cosméticos en Colombia*.
- Pulido Córdoba, L. G. (2009). *EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ÁCIDO HIALURÓNICO, SULFATO DE CONDROITÍN Y SULFATO DE DERMATÁN EN TEJIDOS DE POLLO DE ENGORDA MEXICANO (CRESTA, PIEL Y CARTÍLAGO DEL ESTERNÓN)*. Universidad Veracruzana.
- Ramírez Ramírez, J. (2014). ENZIMAS: ¿QUÉ SON Y CÓMO FUNCIONAN? *Revista Digital Universitaria Universidad Autónoma de México ISSN 1607-6079*, 15(12). <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art91/#>
- Ravetti, S., Clemente, C., Brignone, S., Hergert, L., Allemandi, D., & Palma, S. (2019). Ascorbic acid in skin health. In *Cosmetics* (Vol. 6, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/COSMETICS6040058>
- Rodriguez, C. D., Arteaga, S., Rivas, A., Autrique, R., & Castro, R. (2022). A Review on Current Strategies for Extraction and Purification of Hyaluronic Acid. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11). <https://doi.org/10.3390/ijms23116038>

- Ruckmani, K., Shaikh, S., Khalil, P., Muneera, M. S., & Thusleem, O. A. (2013). Determination of sodium hyaluronate in pharmaceutical formulations by HPLC-UV. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 3(5), 324–329. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2013.02.001>
- Ruiz, J. D. R., Sandoval, E. R., & Hernández, M. S. (2023). Influence of modified cassava starch on the physicochemical properties of a fermented soybean beverage. *Agronomia Colombiana*, 41(1), 1–12. <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v41n1.106936>
- Saranraj, P., & Naidu, M. A. (2013). Hyaluronic Acid Production and its Applications-A Review. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 4(5), 853–859.
- Sciabica, S., Tafuro, G., Semenzato, A., Traini, D., Silva, D. M., Dos Reis, L. G., Canilli, L., Terno, M., Durini, E., Vertuani, S., Baldisserotto, A., & Manfredini, S. (2021). Design, synthesis, characterization, and in vitro evaluation of a new cross-linked hyaluronic acid for pharmaceutical and cosmetic applications. *Pharmaceutics*, 13(10). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101672>
- Serra, H. M., & Cafaro, T. A. (2007). Ascorbic acid: from chemistry to its crucial protective role in the eye. *Bioquímica Clínica*.
- Shahnila, Arif, S., Pasha, I., Iftikhar, H., Mehak, F., & Sultana, R. (2022). Effects of eggshell powder supplementation on nutritional and sensory attributes of biscuits. *Czech Journal of Food Sciences*, 40(1), 26–32. <https://doi.org/10.17221/309/2020-CJFS>
- Shi, Y., Zhou, K., Li, D., Guyonnet, V., Hincke, M. T., & Mine, Y. (2021). Avian eggshell membrane as a novel biomaterial: A review. In *Foods* (Vol. 10, Issue 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/foods10092178>
- Šmejkalová, D., Huerta Angeles, G., Ehlova, T., & Pharma, C. (2015). *Hyaluronan (Hyaluronic Acid): a natural moisturizer for skin care*. <https://www.researchgate.net/publication/272175669>
- Stephanie, C. F. (2021). Diseño de un sistema de extracción de ácido hialurónico y colágeno a partir de membranas de cáscaras de huevo para aplicaciones cosméticas. In *Industry and Higher Education* (Vol. 1, Issue 1). UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ.

- Thiex, N. (2009a). Evaluation of analytical methods for the determination of moisture, crude protein, crude fat, and crude fiber in distillers dried grains with solubles. *Journal of AOAC International*, 92(1), 61–73. <https://doi.org/10.1093/jaoac/92.1.61>
- Thiex, N. (2009b). Evaluation of analytical methods for the determination of moisture, crude protein, crude fat, and crude fiber in distillers dried grains with solubles. *Journal of AOAC International*, 92(1), 61–73. <https://doi.org/10.1093/jaoac/92.1.61>
- Tsagris, M., & Pandis, N. (2021). Normality test: Is it really necessary? In *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* (Vol. 159, Issue 4, pp. 548–549). Mosby Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2021.01.003>
- Urbano Vargas, E. L. (2015a). Extracción de proteínas en las membranas intersticiales de residuos de cáscara de huevo de gallina (*Gallus Domesticus*) mediante el proceso de hidrólisis alcalina [Escuela Politécnica Nacional]. In *Escuela Politécnica Nacional*. <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/10458/3/CD-6190.pdf>
- Urbano Vargas, E. L. (2015b). Extracción de proteínas en las membranas intersticiales de residuos de cáscara de huevo de gallina (*Gallus Domesticus*) mediante el proceso de hidrólisis alcalina. *Escuela Politecnica Nacinal*, 220.
- Ûrgeová, E., & Vulganová, K. (2016a). Comparison of Enzymatic Hydrolysis of Polysaccharides from Eggshells Membranes. *Nova Biotechnologica et Chimica*, 15(2), 133–141. <https://doi.org/10.1515/nbec-2016-0014>
- Ûrgeová, E., & Vulganová, K. (2016b). Comparison of Enzymatic Hydrolysis of Polysaccharides from Eggshells Membranes. *Nova Biotechnologica et Chimica*, 15(2), 133–141. <https://doi.org/10.1515/nbec-2016-0014>
- Vallejo Castillo, V., Muñoz Mera, J., Pérez Bustos, M. F., & Rodrigue Stouvenel, A. (2020). Recovery of antioxidants from papaya (*Carica papaya* L.) peel and pulp by microwave–assisted extraction. *Revista Mexicana de Ingeniera Quimica*, 19(1), 85–98. <https://doi.org/10.24275/rmiq/Alim593>

- Vera Valle, A. (2017). *Desarrollo de un yogur bebible enriquecido con péptidos bioactivos obtenidos de la hidrólisis enzimática de proteínas de suero lácteo utilizando papaina*. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Wang, H., & Slavik, M. F. (1998). Bacterial penetration into eggs washed with various chemicals and stored at different temperatures and times. *Journal of Food Protection*, 61(3), 276–279. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-61.3.276>
- Wangrunroj, N., Soontorntepwarakul, N., Samattai, S., & Tangboriboon, N. (2018). Characteristics on physical-chemical-thermal properties of eggshell membrane for biomaterial applications. *Defect and Diffusion Forum*, 382 DDF, 342–346. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/DDF.382.342>
- Zhu, L., Ma, M., Ahn, D. U., Guyonnet, V., Wang, L., Zheng, Y., He, Q., Xiong, H., & Huang, X. (2022). Hatched Eggshell Membrane Can Be a Novel Source of Antioxidant Hydrolysates to Protect against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Oxidative Stress in Human Chondrocytes. *Antioxidants*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/antiox11122428>

## Anexos

### Anexo 1 Cronograma del proyecto

		2023				2024			
ACTIVIDADES		AGOSTO	SEPTIEMBRE	OCTUBRE	NOVIEMBRE	FEBRERO	MARZO	ABRIL	MAYO
OBJ ESP.	Revisión bibliográfica								
	Redacción de documento								
1	Revisión metodológica								
	Elaboración de diagrama ASME								
	Recolección y acondicionamiento de residuo								
	Separación y secado								
	Caracterización fisicoquímica								
2	Definición de método de obtención de AH								
	Hidrolisis enzimática								
	Cuantificación de AH								
	Almacenamiento de AH								
3	Definición de metodología para caracterización F.Q								
	Caracterización fisicoquímica								
	Análisis de resultados (NTC 4833)								
4	Formulación del sérum								
	Determinación de capacidad antioxidante del sérum								
	Publicación de artículo científico								
	Sustentación de proyecto								

## Anexo 2 Presupuesto del proyecto

PRESUPUESTO 8 MESES				
	Ítem	Descripción	Cantidad	Costo (COP)
Recurso humano	Tres investigadores	Incluye el recurso humano de tres investigadores	3840 horas	\$ 18.558.720
	Asesor	Incluye el recurso humano del asesor	1280Horas	\$ 22.298.667
Materiales y suministros	Residuos	Recolección de residuos en cinco panaderías	30 kg	\$ 25.000
	Reactivos	EDTA 0.5 M	mL	\$ 2.884
		Cisteína	50 g	\$ 68.000
		Buffer acetato de sodio	Kg	\$ 410.165
		Agua	m3	\$ 4.160
		Agua destilada	mL	\$ 2.795
		Papaína	50 g	\$ 62.000
Prestación de servicios	Planta de procesos	Incluye los costos de equipos utilizados en la planta de procesos, que abarca: molino, agitador y secador de bandejas	Tres meses de operación	\$ 520.000
	Laboratorio de química	Incluye los costos de equipos utilizados en el laboratorio de química, que abarca: centrifuga y reactor		\$ 620.000
Otros	Viáticos	Incluye los costos de transporte de ida y vuelta hasta la planta de procesos	Transporte en taxi	\$ 448.000
	E.P.P	Incluye elementos de protección personal como: guantes, tapabocas, toallas desechables, alcohol industrial.		\$ 50.000
	Publicación	Publicación en revista SciELO		\$ 583.000
				<b>\$ 43.653.391</b>

## Anexo 3 Código de programación Python

```
#Bibliotecas
import pandas as pd
import seaborn as sns
import matplotlib.pyplot as plt
from mpl_toolkits.mplot3d import Axes3D
import numpy as np
from statsmodels.formula.api import ols
from statsmodels.stats.anova import anova_lm
import statsmodels.api as sm
from scipy.optimize import minimize
import ipywidgets as widgets
```

```

sales= pd.read_excel('datos.xlsx', sheet_name= 'Analysis')
sales.info()
sales.describe()

# Cargar datos
sales = pd.read_excel('datos.xlsx', sheet_name='Analysis')

# Ajustar modelo de regresión polinomial
model = ols('Pcant_AH_mg_L ~ F1_Concentración_Papaina_mg + F2_Tiempo_h + \
            F1_Concentración_Papaina_mg:F2_Tiempo_h + \
            np.power(F1_Concentración_Papaina_mg, 2) + np.power(F2_Tiempo_h, 2)',
data=sales).fit()

# Obtener tabla ANOVA
anova_table = sm.stats.anova_lm(model, typ=2)
print("Tabla ANOVA:")
print(anova_table)

sns.catplot(x='F1_Concentración_Papaina_mg', y='Pcant_AH_mg_L',
hue='F2_Tiempo_h', data=sales, kind='point')
plt.title('Relación entre Concentración de Papaina, Tiempo y Cantidad AH')
plt.xlabel('Concentración de Papaina (mg)')
plt.ylabel('Cantidad AH (mg/L)')
plt.show()

sns.barplot(x='F2_Tiempo_h', y='Pcant_AH_mg_L',
hue='F1_Concentración_Papaina_mg', data=sales)
plt.title('Efecto de la Concentración de Papaina y Tiempo sobre la Cantidad AH')
plt.xlabel('Tiempo (h)')
plt.ylabel('Cantidad AH (mg/L)')
plt.legend(title='Concentración de Papaina (mg)')
plt.show()

# Generar superficie de respuesta
x = np.linspace(sales['F1_Concentración_Papaina_mg'].min(),
sales['F1_Concentración_Papaina_mg'].max(), 100)
y = np.linspace(sales['F2_Tiempo_h'].min(), sales['F2_Tiempo_h'].max(), 100)
x_surf, y_surf = np.meshgrid(x, y)
exog = pd.core.frame.DataFrame({'F1_Concentración_Papaina_mg': x_surf.ravel(),
'F2_Tiempo_h': y_surf.ravel()})
exog['F1_Concentración_Papaina_mg:F2_Tiempo_h'] =
exog['F1_Concentración_Papaina_mg'] * exog['F2_Tiempo_h']
exog['F1_Concentración_Papaina_mg^2'] = exog['F1_Concentración_Papaina_mg'] ** 2
exog['F2_Tiempo_h^2'] = exog['F2_Tiempo_h'] ** 2

```

```

z_surf = model.predict(exog)

# Encontrar punto óptimo (máximo)
max_index = np.argmax(z_surf)
optimal_point = (x_surf.ravel()[max_index], y_surf.ravel()[max_index],
z_surf.values[max_index])

# Plot de la superficie de respuesta con el punto óptimo y las líneas de
intersección
fig = plt.figure(figsize=(10, 5))
ax = fig.add_subplot(111, projection='3d')
surf = ax.plot_surface(x_surf, y_surf, z_surf.values.reshape(x_surf.shape),
cmap='viridis', alpha=0.95)

# Trazar líneas de intersección para el punto óptimo
ax.plot([optimal_point[0]], [optimal_point[1]], [optimal_point[2]], color='red',
marker='o', markersize=5)
ax.plot([optimal_point[0], optimal_point[0], optimal_point[1],
optimal_point[1], [sales['Pcant_AH_mg_L'].min(), optimal_point[2]],
color='red', linestyle='--')
ax.plot([optimal_point[0]], [optimal_point[1]], [sales['Pcant_AH_mg_L'].min()],
color='red', marker='o', markersize=5)

ax.plot([optimal_point[0], optimal_point[0], [sales['F2_Tiempo_h'].min(),
optimal_point[1]], [optimal_point[2], optimal_point[2]], color='red',
linestyle='--')
ax.plot([optimal_point[0]], [optimal_point[1]], [optimal_point[2]], color='red',
marker='o', markersize=5)

ax.plot([sales['F1_Concentración_Papaina_mg'].min(), optimal_point[0]],
[optimal_point[1], optimal_point[1]], [optimal_point[2], optimal_point[2]],
color='red', linestyle='--')
ax.plot([optimal_point[0]], [optimal_point[1]], [optimal_point[2]], color='red',
marker='o', markersize=5)

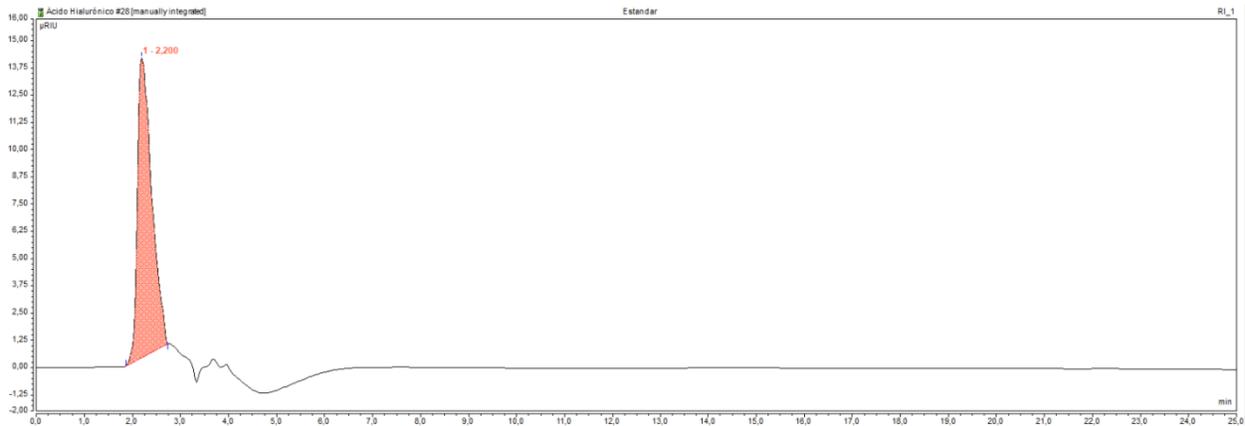
ax.set_xlim(sales['F1_Concentración_Papaina_mg'].min(),
sales['F1_Concentración_Papaina_mg'].max())
ax.set_ylim(sales['F2_Tiempo_h'].min(), sales['F2_Tiempo_h'].max())
ax.set_zlim(sales['Pcant_AH_mg_L'].min(), sales['Pcant_AH_mg_L'].max())

ax.set_xlabel('Concentración de Papaina (mg)')
ax.set_ylabel('Tiempo (h)')
ax.set_zlabel('Cantidad AH (mg/L)')
ax.set_title('Superficie de Respuesta con Modelo de Regresión Polinomial')

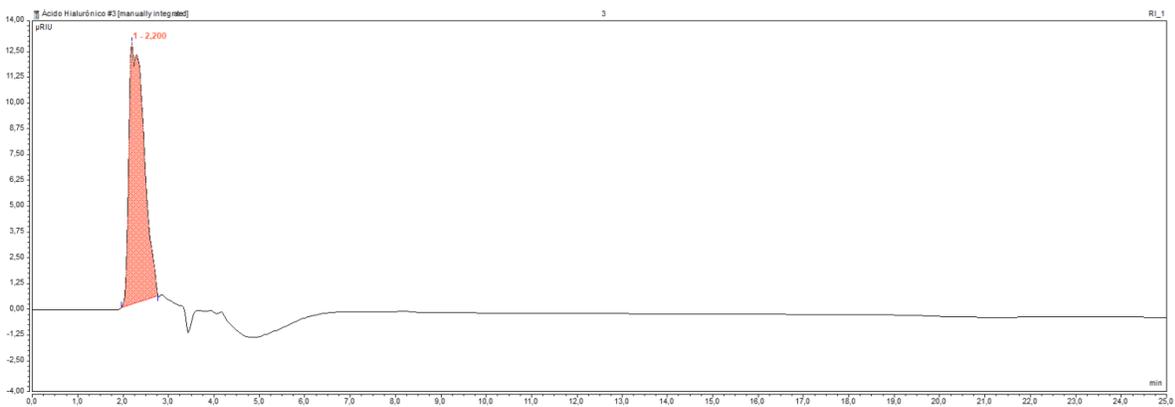
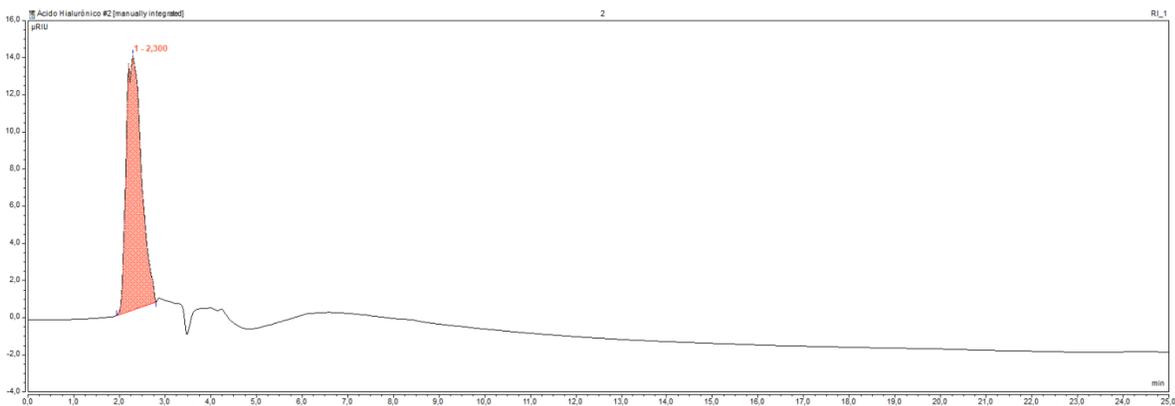
```

```
fig.colorbar(surf, shrink=0.5, aspect=5)  
plt.show()
```

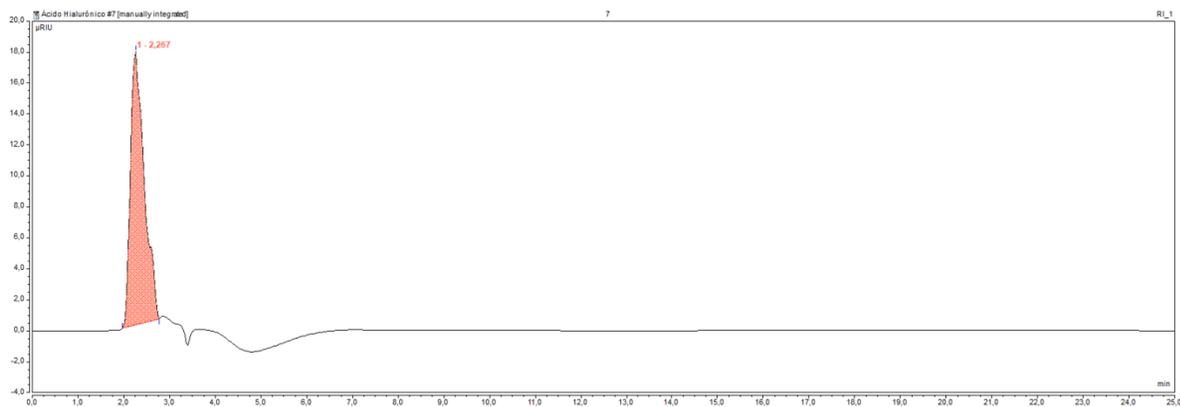
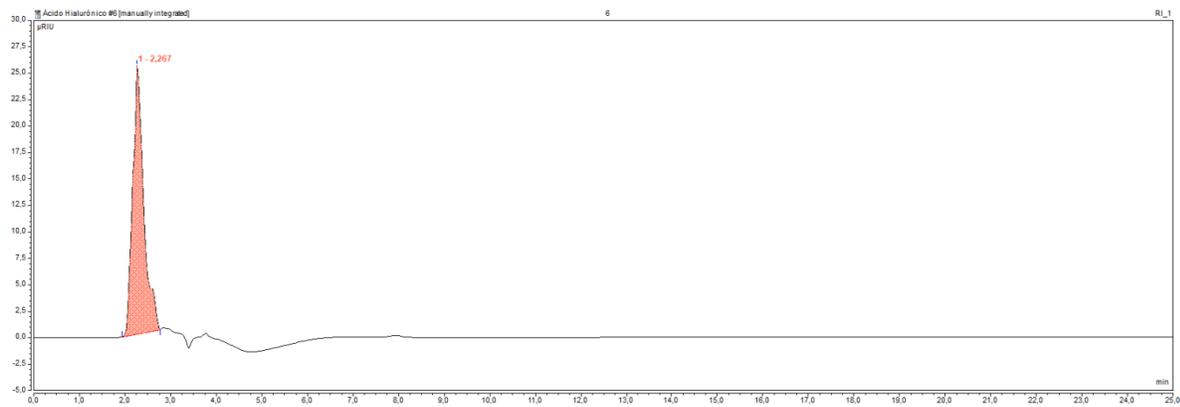
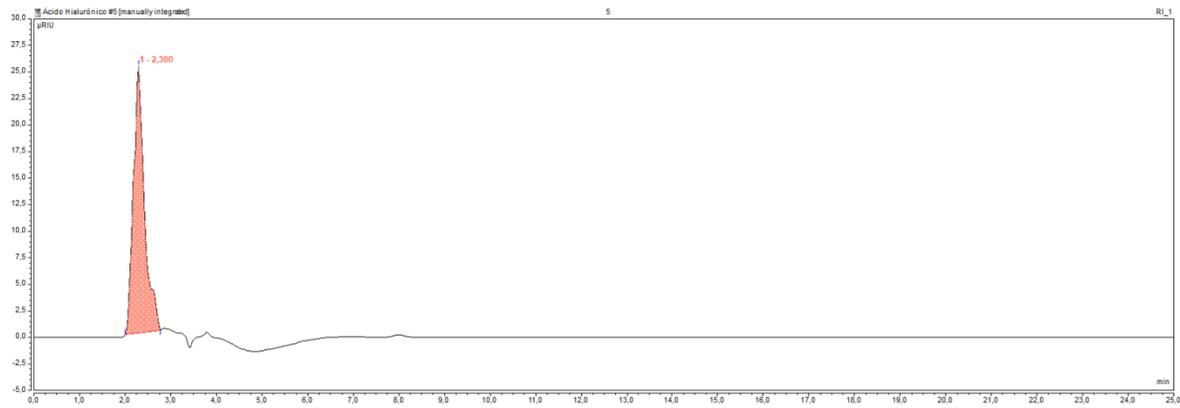
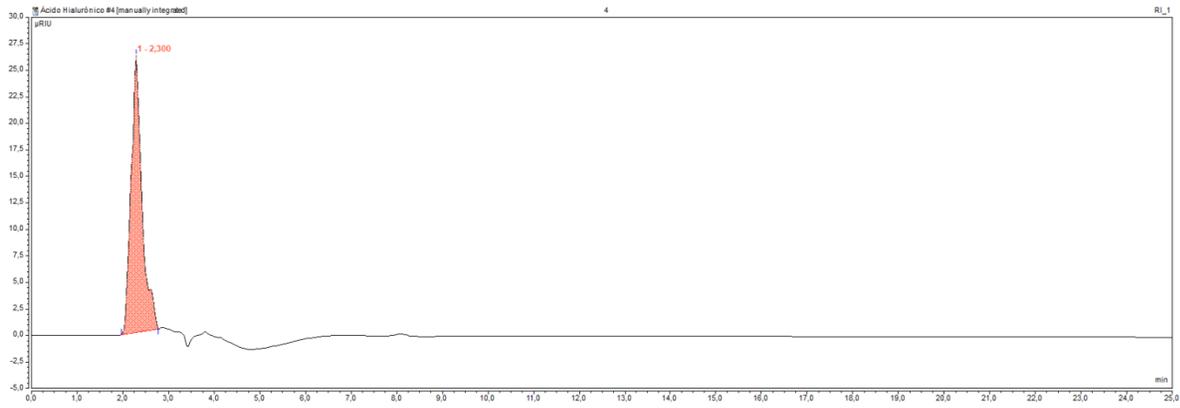
### Anexo 4 Cromatogramas HPLC



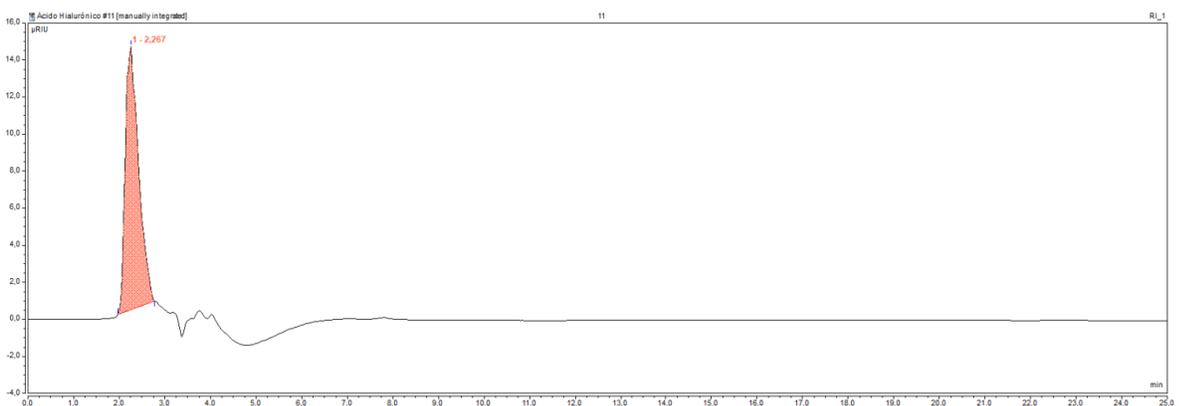
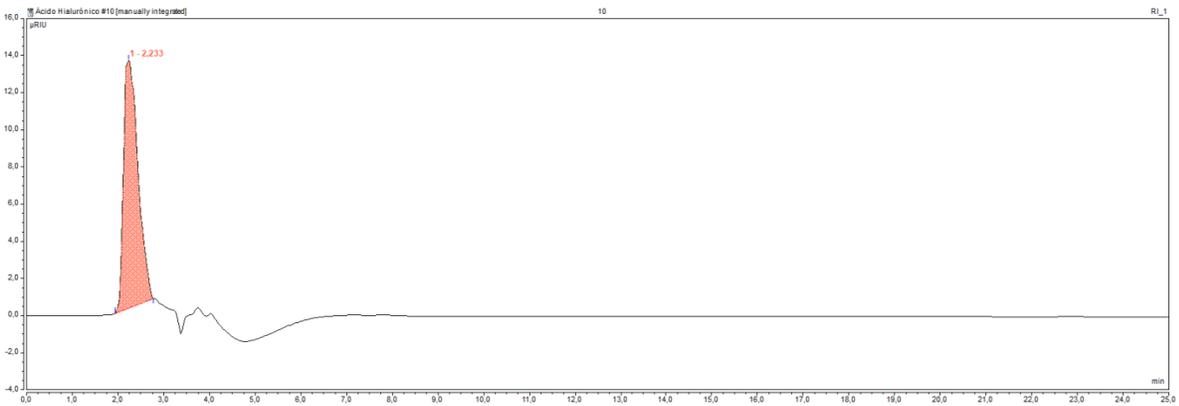
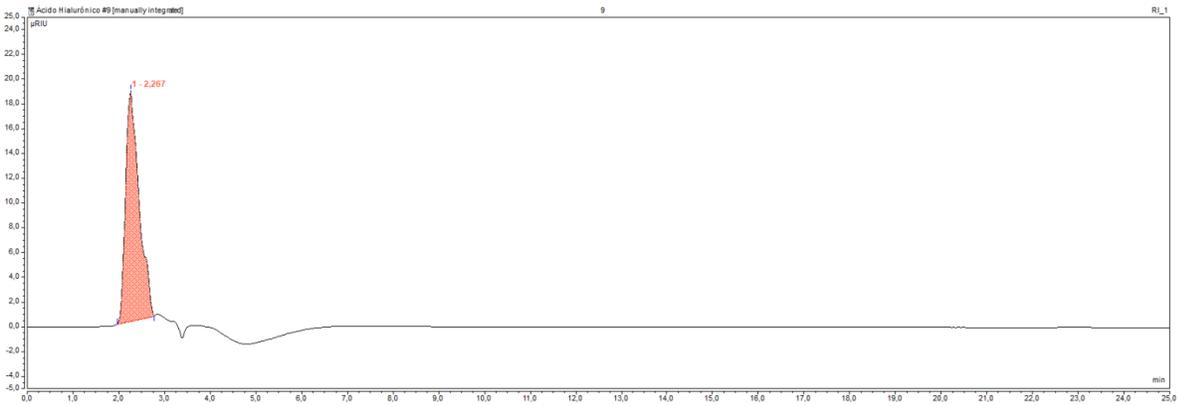
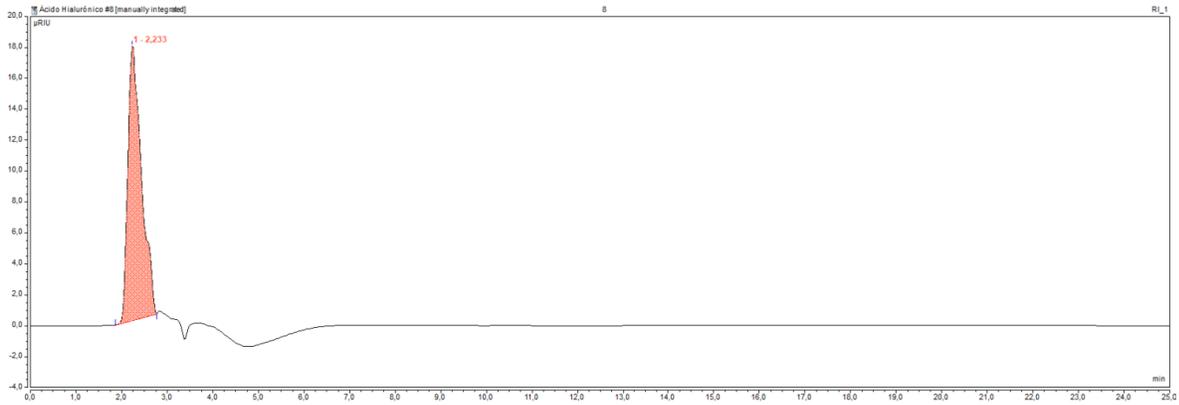
### Anexo 5 Cromatogramas muestras N°2-27



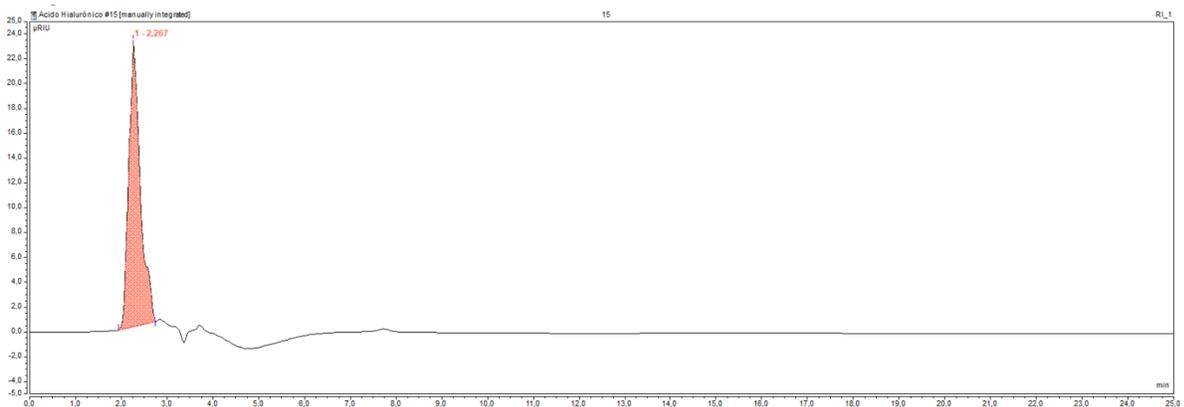
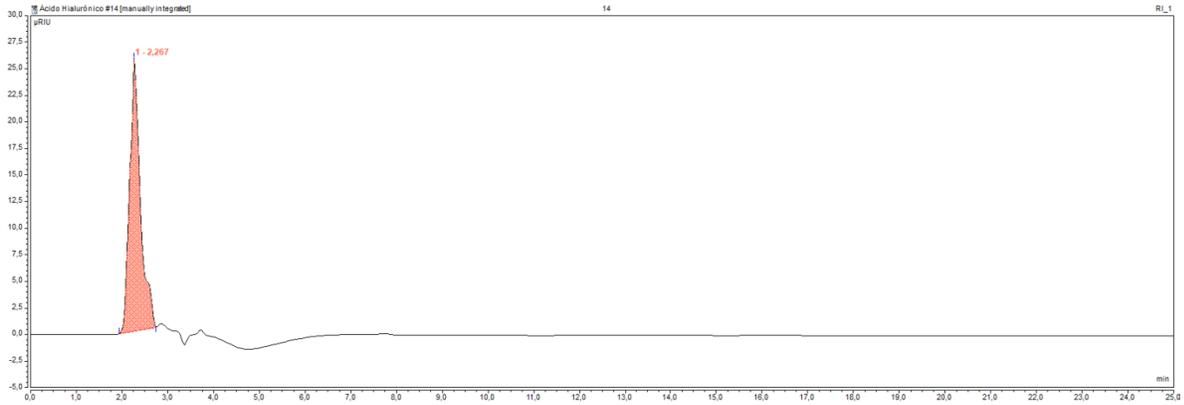
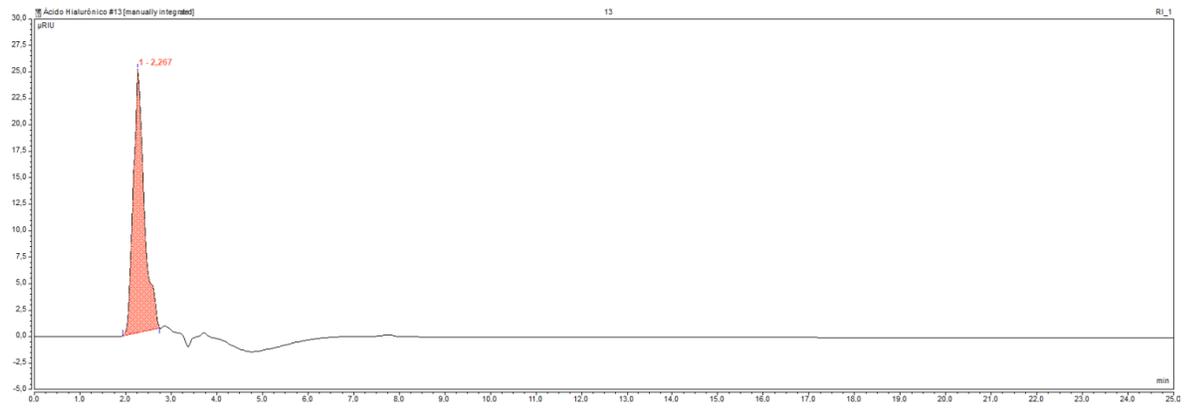
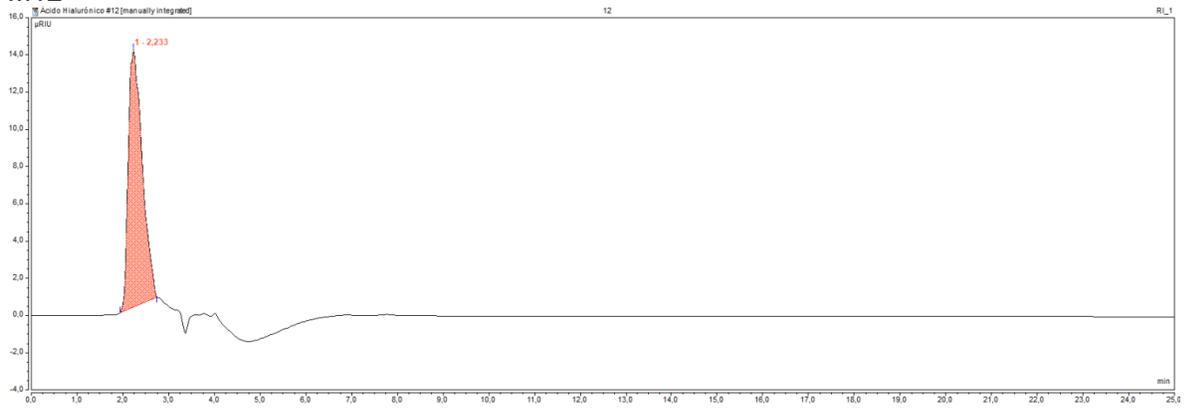
Obtención de AH de la membrana de cáscara de huevo



Obtención de AH de la membrana de cáscara de huevo



Obtención de AH de la membrana de cáscara de huevo



Obtención de AH de la membrana de cáscara de huevo

