

**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE LAS
AMÉRICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA DE FARMACIA



**EXTRACCIÓN DEL ÁCIDO HIALURÓNICO A PARTIR DE
LAS MEMBRANAS TESTÁCEAS PRESENTES EN LAS
CÁSCARAS DE HUEVO MEDIANTE HIDRÓLISIS
ENZIMÁTICA CON PEPSINA EN LA UNIVERSIDAD
INTERNACIONAL DE LAS AMÉRICAS, EN LOS AÑOS 2021-
2022**

Sustentante:

Joselin Gómez Oviedo

Tutor:

Dr. Hugo Leandro Alpizar

MARZO 2022

Modalidad de tesis para optar por el grado de Licenciatura en Farmacia

I. Resumen

En el presente trabajo de investigación se realizó la extracción del ácido hialurónico a partir de las membranas testáceas presentes en las cáscaras mediante hidrólisis enzimática con pepsina, este procedimiento se determinó con base en varios artículos y una patente, lo cual fue de suma relevancia para empezar a desarrollar este estudio. Las cáscaras de huevo de gallina fueron recolectadas por varias semanas gracias a la colaboración de la Panadería Grecia, que proporcionó este material; esto con el fin de controlar las posibles variables que podrían afectar en los resultados con respecto a las cáscaras de huevo, además de los cuidados preliminares de la materia prima.

El objetivo de este Trabajo Final de Graduación fue diseñar una metodología de extracción del ácido hialurónico a partir de las membranas testáceas presentes en las cáscaras de huevo utilizando pepsina como agente hidrolizante y haciendo una evaluación cualitativa y cuantitativa del compuesto extraído. La metodología realizada posee un enfoque de tipo mixto ya que se examinaron datos cuantitativos y cualitativos para dar una interpretación final de todos los resultados recopilados. Además, tiene un diseño exploratorio de tipo secuencial comparativo.

Como principales resultados se obtuvo que la señal de la banda más significativa para la espectroscopia infrarroja (IR) entre el estándar del ácido hialurónico y las muestras a analizar fue la de alrededor de 1600 cm^{-1} , donde aparecen las señales los grupos funcionales C=O, C=C y C=N, presentes en la molécula de este compuesto. También, el método utilizado para el estudio por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) fue eficiente con las condiciones propuestas.

Finalmente, como conclusiones trascendentales se logró obtener los objetivos específicos planteados y con esto, cumplir con la finalidad de esta investigación, ya que se consiguió el procedimiento, evaluar cualitativa y cuantitativamente el extracto, siendo así que la cantidad aproximada de ácido hialurónico en las muestras fue alrededor de 19.73mg, 20.20 mg y 34.52 mg de las muestras 1, 2 y 3, respectivamente, de un total de 6 gramos de membrana testácea seca para cada muestra.

II. Agradecimientos

Primordialmente, quiero agradecer a Dios por brindarme la vida y salud, por ser mi guía en la vida, estar siempre conmigo y con mi familia. Por todas las bendiciones y oportunidades a lo largo de estos años.

A mis padres, por todo el esfuerzo y apoyo incondicional que me han dado siempre, por confiar y creer en mis capacidades, por motivarme todos los días a ser mejor persona en esta sociedad. Los amo con todo mi corazón.

A mis hermanas, por todo el apoyo y la ayuda que me han brindado durante mi carrera, y acompañarme en este camino de vida con tantas experiencias juntas.

A mi tutor Dr. Hugo Leandro Alpízar, por todo su apoyo, acompañamiento y asesoramiento desde el inicio de esta investigación hasta el final; es un excelente profesional y un gran ser humano.

Al personal de laboratorio de la Universidad Internacional de las Américas, sobre todo a Yendry y Taylor, quienes siempre estuvieron anuentes a colaborar conmigo con mucha paciencia. Siempre me brindaron su apoyo incondicional en esta etapa experimental. ¡Muchísimas gracias!

A todos los profesores que estuvieron presente en mi formación académica, muchas gracias por su compartir sus conocimientos y hacer de esta una bonita experiencia.

A todos mis amigos y compañeros que serán mis futuros colegas, gracias por el apoyo mutuo en toda la formación profesional y personal, por compartir alegrías, tristezas, cariño en todo este tiempo. ¡A todos por nombre gracias! Especialmente a José Pablo, María José, Pablo, Ariana y María Paula. ¡Los quiero mucho! Si Dios lo permite vamos a llegar muy lejos y seremos grandes profesionales.

A la Universidad Internacional de las Américas por brindarme los recursos necesarios para realizar esta investigación.

III. Dedicatoria

Este Trabajo Final de Graduación se lo dedico primeramente a Dios, porque gracias a Él he logrado todo lo que me he propuesto en la vida. Por brindarme la sabiduría, por haberme dado la salud para lograr mis objetivos y por permitirme la oportunidad de llegar hasta este punto venciendo todos los obstáculos que se presentaron en el camino.

A mis padres Modesto y Carmen, por enseñarme que todo esfuerzo tiene su recompensa, por siempre anteponer sus propios intereses personales en apoyo a mi formación. Por la motivación constante e instruirme a ser una persona de bien, son un ejemplo para mí. Han sido mis pilares y me han brindado su amor incondicionalmente.

A mis hermanas Guadalupe, Graciela, Ana y Kristel; a mis hermanos Luis Gustavo y Juan Gabriel, por ser un ejemplo de lucha para mí, por escucharme y aconsejarme siempre. ¡Los amo!
¡Esta felicidad también la comparto con ustedes!

A mi pareja, Jean Carlo, por siempre contar con su apoyo, por hacerme compañía en mis desvelos, por ayudarme en lo que fuera posible, escuchar mis frustraciones, animarme a seguir adelante y no rendirme a pesar de las dificultades.

A mi mejor amiga Gabriela, quien, aunque a pesar de la distancia siempre estuvo para mí dispuesta a ayudarme en lo que sea. Una amistad de años, desde el kínder, que ha sido para mí un valioso tesoro.

A todos los que forman parte de mi familia y que de alguna manera me ayudaron durante esta etapa de mi vida.

Tabla de contenido

Lista de Tablas	10
Lista de Figuras	12
CAPÍTULO I- INTRODUCCIÓN.....	15
1.1 Planteamiento del problema.....	16
1.2 Objetivos	18
1.2.1 Objetivo General.....	18
1.2.2 Objetivos Específicos.....	18
1.3 Justificación	18
1.4 Antecedentes	21
1.4.1 Antecedentes Históricos.....	21
1.4.2 Antecedentes Internacionales.....	22
1.4.3 Antecedentes Nacionales	24
1.5 Proyecciones	24
CAPÍTULO II- MARCO TEÓRICO.....	25
2.1 Industria cosmética y cosmeceúticos	26
2.1.1 Cosméticos de origen natural.....	27
2.1.2 Cosméticos de origen animal	29
2.1.3 Envejecimiento de la piel y el uso de cosméticos.....	30
2.1.4 Cosméticos a base de huevo.....	36
2.1.4.1 Beneficios de la clara de huevo sobre la piel.....	37

2.1.4.2 Beneficios de cáscara de huevo sobre la piel.....	38
2.1.4.3 Beneficios de la yema de huevo sobre la piel	39
2.1.4.4 Reacciones adversas del huevo sobre la piel	39
2.2 Fisiología del huevo de gallina.....	40
2.2.1 Partes del huevo	43
2.2.1.1 Yema	45
2.2.1.2 Clara	46
2.2.1.3 Cáscara.....	48
2.3 Composición de la cáscara.....	50
2.3.1 Membranas testáceas de la cáscara	51
2.3.2 Composición química del huevo y sus partes	55
2.4 Usos del huevo.....	57
2.5 Extracción de proteínas de las cáscaras de huevo.....	59
2.5.1 Separación química de la cáscara y membranas por disolución de la fase mineralizada.....	61
2.5.2 Separación física de la cáscara y membranas por diferencia de densidades	62
2.6 Extracción de compuestos de membrana de huevo	66
2.6.1 Extracción de ácido hialurónico por el método de hidrólisis.....	70
2.6.1.1 Enzimas en procesos de extracción de ácido hialurónico	74
2.7 Ácido Hialurónico.....	75
2.7.1 Tipos de ácido hialurónico.....	78
2.7.2 Síntesis y degradación del ácido hialurónico	79
2.7.3 Aplicaciones médicas del ácido hialurónico y sus derivados a	81

2.7.3.1 En la osteoartritis y en la regeneración del cartílago	82
2.7.3.2 Oftalmología	84
2.7.3.3 Piel	86
2.7.3.4 Tejido vascular	90
2.7.3.5 Nervio periférico	91
2.7.3.6 Tejido adiposo.....	91
2.8 Cuantificación de sustancias para uso cosmético	93
2.8.1 Cromatografía líquida	94
2.8.2 Cromatografía líquida con exclusión de tamaño molecular.....	95
CAPÍTULO III- MARCO METODOLÓGICO.....	97
3.1 Enfoque de la investigación	98
3.2 Diseño de la investigación	98
3.3 Fuentes de información	99
3.3.1 Muestra.....	99
3.3.2 Criterios de inclusión y exclusión.....	100
3.4 Unidades de análisis.....	101
3.4.1 Instrumento	104
3.5 Recolección y Análisis de Datos.....	107
3.5.1 Recolección de Datos.....	107
3.5.1.1 Materia prima y tratamientos preliminares	111
3.5.1. 2 Limitaciones del estudio	114
3.5.2 Análisis de Datos	114

CAPÍTULO IV- ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	117
4.1 Realización de extracción del ácido hialurónico a partir de las membranas testáceas presentes en las cáscaras de huevo utilizando un método bioquímico.	118
4.1.1 Experimento 1	120
4.1.2 Experimento 2	121
4.2 Evaluación cualitativamente el ácido hialurónico extraído a partir de las membranas testáceas presentes en las cáscaras de huevo utilizando métodos fisicoquímicos e instrumentales.	127
4.3. Cuantificación del ácido hialurónico extraído a partir de las membranas testáceas presentes en las cáscaras de huevo.	135
CAPÍTULO V- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	145
5.1 Conclusiones	146
5.2 Recomendaciones.....	147
CAPÍTULO VI-REFERENCIAS BIBLOGRÁFICAS.....	149
CAPÍTULO VII- ANEXOS.....	162
Anexo 1. Comparación de Muestra 1 con estándar de AH de manera individualizada.....	163
Anexo 2. Comparación de Muestra 2 con estándar de AH de manera individualizada.....	163
Anexo 3. Comparación de Muestra 3 con estándar de AH de manera individualizada.....	164
Anexo 4. Comparación de Muestras con estándar de AH de manera individualizada.....	164
Anexo 5. Cromatograma HPLC del estándar 3.5.....	165

Anexo 6. Cromatograma HPLC del estándar 3.4.....	165
Anexo 6. Cromatograma HPLC del estándar 3.3.....	166
Anexo 7. Cromatograma HPLC del estándar 3.2.....	166
Anexo 8. Cromatograma HPLC del estándar 3.1.....	167
Anexo 9. Cromatograma HPLC del estándar 2.5.....	167
Anexo 10. Cromatograma HPLC del estándar 2.4.....	168
Anexo 11. Cromatograma HPLC del estándar 2.3.....	168
Anexo 12. Cromatograma HPLC del estándar 2.2.....	169
Anexo 13. Cromatograma HPLC del estándar 2.1.....	169
Anexo 14. Cromatograma HPLC del estándar 1.5.....	170
Anexo 15. Cromatograma HPLC del estándar 1.4.....	170
Anexo 16. Cromatograma HPLC del estándar 1.3.....	171
Anexo 17. Cromatograma HPLC del estándar 1.2.....	171
Anexo 18. Cromatograma HPLC del estándar 1.1.....	172
Anexo 19. Cromatograma HPLC del blanco de Fase Móvil 1	172
Anexo 20. Cromatograma HPLC del blanco de Fase Móvil 2	173
Anexo 21. Cromatograma HPLC del blanco de muestras	173
Anexo 22. Cromatograma HPLC de la muestra 3.3	174
Anexo 23. Cromatograma HPLC de la muestra 3.2	174
Anexo 24. Cromatograma HPLC de la muestra 3.1	175
Anexo 25. Cromatograma HPLC de la muestra 2.3	175

Anexo 26. Cromatograma HPLC de la muestra 2.2	176
Anexo 27. Cromatograma HPLC de la muestra 2.1	176
Anexo 28. Cromatograma HPLC de la muestra 1.3	177
Anexo 29. Cromatograma HPLC de la muestra 1.2	177
Anexo 30. Cromatograma HPLC de la muestra 1.1	178

Lista de Tablas

Tabla 1. Composición del huevo por partes.....	55
Tabla 2. Porcentajes respectivos de la cáscara del huevo	55
Tabla 3. Propiedades de las gallinas y huevos utilizados para las muestras de membranas	100
Tabla 4. Operacionalización de categorías para datos cualitativos.....	101
Tabla 5. Operacionalización de variables para datos cuantitativos	102
Tabla 6. Equipos utilizados y materiales con el propósito de utilización en la investigación	105
Tabla 7. Cronograma de tareas experimentales para cada objetivo a cumplir con fechas tentativas.....	108
Tabla 8. Condiciones de operación cromatográficas para el análisis de ácido hialurónico	116
Tabla 9. Pesos de membranas testáceas del experimento 1 en balanza analítica #13 ADAM Nimbus ± 0.0001 g	118
Tabla 10. Pesos de membranas testáceas del experimento 2 en balanza analítica #13 ADAM Nimbus ± 0.0001 g	119
Tabla 11. Resumen de condiciones de hidrólisis enzimática con pepsina.....	125
Tabla 12. Descripción de apariencia física de la muestra representativa del hidrolizado de membrana después de la filtración del experimento 1	127
Tabla 13. Descripción de apariencia física de la muestra representativa del hidrolizado de membrana a varios días después de la extracción del experimento 1	128
Tabla 14. Descripción de apariencia física de la muestra representativa del hidrolizado de membrana a los pocos días de la extracción del experimento 2	129
Tabla 15. Descripción de apariencia física de la muestra representativa del hidrolizado de membrana a varios días después de la extracción del experimento 2.....	129
Tabla 16. Datos para los cálculos de densidad del hidrolizado.	136
Tabla 17. Condiciones experimentales y secuencia de análisis	138

Tabla 18. Tiempos de retención de los patrones de AH a diferentes concentraciones y de las muestras de hidrolizado 141

Tabla 19. Resultados de las réplicas de las áreas de los patrones de AH a diferentes concentraciones y de las muestras de hidrolizado el tiempo de retención de entre 6 y 7 minutos..... 141

Tabla 20. Datos utilizados para la curva de calibración 142

Tabla 21. Resultados de las concentraciones y cantidades aproximadas de AH en las muestras de hidrólisis de membrana. 144

Tabla 22. Cálculos estadísticos para las muestras..... 144

Lista de Figuras

Figura 1. Anatomía de la piel humana	30
Figura 2. La radiación ultravioleta y el tabaquismo afectan la estabilidad del ADN, causando alteración en la estructura de la molécula debido a la formación de mutaciones que se acumulan y promueven la transformación celular maligna	34
Figura 3. Representación de la formación del huevo de gallina en el oviducto	42
Figura 4. Partes principales del huevo de gallina.....	43
Figura 5. Estructura y subdivisiones del huevo de gallina.....	45
Figura 6. Cáscara del huevo, cutícula y membrana	49
Figura 7. Imagen de microscopio electrónico de barrido (SEM), de la estructura de cáscara de huevo de gallina	50
Figura 8. Cáscara de huevo y membranas externa pegada a esta	51
Figura 9. Imagen de microscopio electrónico de barrido (SEM), de las membranas de la cáscara de huevo de gallina.....	52
Figura 10. Representación y fotografía de las localizaciones y estructuras de las membranas testáceas del huevo de gallina	53
Figura 11. Cámara de aire entre cáscara y membranas del huevo	54
Figura 12. Composición de la yema y clara.....	56
Figura 13. Esquema de organización de la estructura general de las glicoproteínas	59
Figura 14. Configuración de los componentes de los proteoglicanos.....	60
Figura 15. Disolución de la cáscara de huevo de gallina en HCl de diferentes concentraciones a 20 °C y a distintos tiempos.....	61
Figura 16. Descripción de los componentes del agitador de brazo de arrastre	63

Figura 17. Representación del funcionamiento del equipo para la separación física de las membranas intersticiales y cáscara a partir de residuos de cáscara de huevo de gallina	64
Figura 18. Representación del equipo para la separación física de las membranas y cáscaras a partir de residuos de cáscara de huevo de gallina.....	66
Figura 19. Obtención de un extracto proteico.....	69
Figura 20. Representación del mecanismo de reacción de hidrólisis sobre el enlace peptídico.....	71
Figura 21. Proceso de extracción de proteínas a partir de membranas intersticiales de cáscara de huevo de gallina.....	73
Figura 22. Estructura de ácido hialurónico y el enlace de unión entre el ácido D-glucurónico y la N-acetil-glucosamina	76
Figura 23. Composición del ácido hialurónico por N-acetil- D-glucosamina y ácido D-glucurónico alternantes y representación de la hialuronidasa	77
Figura 24. Esquemas de una matriz extracelular intacta (A) y diseminada (B) después de la actividad de la hialuronidasa	77
Figura 25. Tipos ácido hialurónico según su densidad	79
Figura 26. Funciones del Ácido hialurónico en la cicatrización.....	88
Figura 27. Resultados obtenidos luego de un tratamiento antiarrugas con ácido hialurónico	89
Figura 28. Representación esquemática de un HPLC.....	95
Figura 29. Cromatografía de exclusión molecular (SEC).....	96
Figura 30. Esquema resumen del proceso de extracción y verificación del ácido hialurónico	111

Figura 31. Procedimiento de extracción mediante hidrólisis enzimática con pepsina del experimento 1.....	120
Figura 32. Procedimiento de extracción mediante hidrólisis enzimática con pepsina del experimento 2.....	122
Figura 33. Propuesta final del proceso de extracción por kilogramo de membranas testáceas secas.....	126
Figura 34. Filtración de las muestras del experimento 2 al cabo de varios días mediante jeringas y trompos de filtro 0.20 μm	130
Figura 35. Filtración de las muestras del experimento 2 al cabo de varios días mediante filtración al vacío.....	131
Figura 36. Estructura del ácido hialurónico.....	132
Figura 37. Comparación de la muestra 1 con respecto al estándar de AH.....	133
Figura 38. Comparación de la muestra 2 con respecto al estándar de AH.....	133
Figura 39. Comparación de la muestra 3 con respecto al estándar de AH.....	134
Figura 40. Comparación de las muestras 1, 2 y 3 con respecto al estándar de AH.....	134
Figura 41. Espectroscopia IR de la pepsina.....	135
Figura 42. Resultado representativo del pH de las muestras del hidrolizado.....	137
Figura 43. Cromatograma típico por HPLC del ácido hialurónico.....	139
Figura 44. Cromatograma HPLC del ácido hialurónico experimental.....	139
Figura 45. Cromatograma HPLC representativo de las muestras.....	140
Figura 46. Cromatograma HPLC del Blanco.....	140
Figura 47. Curva de calibración de Ácido Hialurónico.....	143

CAPÍTULO I- INTRODUCCIÓN

1.1 Planteamiento del problema

La piel siempre se encuentra en constante exposiciones por ejemplo a la luz solar y, por lo tanto, tiende a sufrir graves daños a causa de esta, y además que no siempre existen los cuidados debidos por parte de las personas para tratar o prevenir la deshidratación grave. Entre las repercusiones por mencionar algunas, se encuentran: el cáncer de piel, aparición de melanomas, carcinomas, arrugas prematuras, manchas, foto envejecimiento, entre otras. Es debido a esta problemática que se encuentra activa todos los días, una posible alternativa para intentar reducir estos efectos de la deshidratación cutánea es la aplicación de sustancias que humecten la piel, como lo es el ácido hialurónico por sus propiedades¹.

A la piel no siempre se le da la importancia que merece, porque existen muchas funciones que se le pueden atribuir a ella, ya que puede servir como barrera protectora, puede controlar o regular la temperatura y mantener la homeostasis en el cuerpo de manera interna. Lamentablemente el estado de la piel de las personas muchas veces se ve afectado de manera negativa por condiciones externas como los rayos ultravioletas (UV), procesos de inflamación, entre otros. Así mismo, también se ven implicados factores internos, como lo son el envejecimiento y el estrés, estos hacen que se obtenga como resultado que su función normal se vea alterada².

Asimismo, el ácido hialurónico que se encuentra en la piel de manera natural figura casi la mayor parte de este componente del total que existe en el cuerpo (aproximadamente 50%) y conforme la edad va avanzando en las personas, disminuyen los niveles de dicho polisacárido de manera importante dando así un aspecto más delgado y seco, particular de la piel envejecida. Debido a la gran capacidad higroscópica que posee como característica el ácido hialurónico, hace que se utilice en muchos tipos de cosméticos, siendo así relevante en la dermatofarmacia de la actualidad en la calidad de la salud de la piel³.

Como etapa normal de las personas y como destino inexorable, no se puede detener el envejecimiento en la piel que trae consigo la pérdida de vascularización en el proceso de reproducción de las células, bien conocidas como fibroblastos, así mismo de fibras

colágenas y más que todo de ácido hialurónico, que conduce a la deshidratación y pérdida de volumen. El efecto esperado hidratante se pierde debido a que mientras la edad progresa en el tiempo, los fibroblastos disminuyen en cuanto a la capacidad de producir ácido hialurónico, generando así que este sea de menor peso molecular con respecto al original; también otro inconveniente es el incremento de los radicales libres en el intersticio, que apresura la destrucción a nivel molecular del ácido hialurónico⁴.

Por otra parte, los residuos o desechos agrícolas constituyen una problemática de los procesadores de alimentos, donde esta cantidad de restos y el costo por eliminarlos contribuye con el inconveniente general; un ejemplo de esto es la eliminación de los restos de las cáscaras de huevo de gallina. Lo que muchas personas no saben, y es ahí donde se puede llenar el vacío de conocimiento en la población, es que las cáscaras de huevo, en su membrana interna, contienen varios componentes que son valiosos para muchas ramas de la industria, debido a que se pueden extraer algunos tipos de colágenos, ácido hialurónico o aminoácidos y se pueden depurar para usos en cosméticos, por ejemplo⁵.

Proporcionada toda la problemática planteada en los aspectos anteriormente mencionados, nace la necesidad de efectuar este Trabajo Final de Graduación, en la cual en este proyecto investigación se pretende demostrar la obtención del ácido hialurónico mediante la extracción a partir de las membranas testáceas presentes en las cáscaras de huevo mediante la técnica de hidrólisis. Es por esto por lo que surge la siguiente pregunta de investigación: ¿Qué tan significativa puede ser la extracción del ácido hialurónico a partir de las membranas testáceas presentes en las cáscaras de huevo mediante hidrólisis enzimática con pepsina en la Universidad Internacional de las Américas en los años 2021-2022?

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo General

Diseñar una metodología de extracción del ácido hialurónico a partir de las membranas testáceas presentes en las cáscaras de huevo utilizando pepsina como agente hidrolizante y realizando una evaluación cualitativa y cuantitativa del compuesto extraído.

1.2.2 Objetivos Específicos

Realizar extracción del ácido hialurónico a partir de las membranas testáceas presentes en las cáscaras de huevo utilizando un método bioquímico.

Evaluar cualitativamente el ácido hialurónico extraído a partir de las membranas testáceas presentes en las cáscaras de huevo utilizando métodos fisicoquímicos e instrumentales.

Cuantificar el ácido hialurónico extraído a partir de las membranas testáceas presentes en las cáscaras de huevo.

1.3 Justificación

En el año 1995 el ácido hialurónico sustituyó al colágeno en administración inyectable, mientras que, en el 2006 en los Estados Unidos de América el 83% de los casi once millones de procedimientos cosméticos ejecutados fueron mínimamente invasivos. El 85% del total de los rellenos manipulados son de ácido hialurónico. Debido a esto se ve manifestada la alta solicitud en el mercado para este tipo de procedimientos, donde tienen garantía en cuanto al perfil de seguridad, efectividad, y tienen menos invasión que aquellos métodos quirúrgicos⁶.

El ácido hialurónico purificado suele ser usado en diversos tratamientos como por ejemplo en la osteoartritis, también podría aplicar en la ginecología, cicatrización de heridas, dermatología y rinología, donde se administra con éxito para disminuir los efectos

secundarios o efectos adversos. Las membranas de cáscara de huevo se pueden utilizar como un nuevo recurso natural, en el que de forma natural se hallan glicosaminoglicanos y proteínas esenciales para mantener los tejidos sanos. Así mismo, las funciones primordiales que hablan biológicamente del ácido hialurónico contienen el apoyo a la viscoelasticidad del tejido conectivo y en su hidratación⁷.

En la actualidad, hay una alta demanda de aquellos consumidores de productos cosméticos que dentro de ellos tengan ingredientes naturales. La membrana de las cáscaras de huevo es una sustancia que ha logrado manifestar que incrementa la actividad celular y además la producción de colágeno; esta membrana retrasa el envejecimiento de la piel y ayuda a disminuir el daño provocados por la luz UV y los procesos de inflamación. Es debido a esto que los ingredientes de origen natural han dado un desarrollo en productos cosméticos para la hidratación y recuperación de la piel para equilibrar el envejecimiento².

Además, en las últimas décadas se ha conseguido observar una particular moda por parte de las personas que utilizan cosméticos por aquellos productos que, dentro de su fórmula, posean ingredientes naturales y también en otras áreas en las que se puedan usar como Medicina o Farmacia⁸. Esta tendencia natural asimismo está altamente relacionada con el uso de cosméticos, donde en su elaboración no haya testeos en animales, y esta se encuentra apoyada por el veganismo. Aunque pareciera contrario que el uso de huevo de gallina concuerde con la corriente de veganismo, posiblemente la extracción de ácido hialurónico que propone esta tesis, sea más compatible con tendencias que están en contra del maltrato y de testeos en animales.

La membrana que se encuentra en la cáscara de huevo está situada entre la cáscara y la clara de huevo; además, es una bicapa insoluble. Posee una estructura fibrosa y exhibe efectos antimicrobianos y antibacterianos; además, es rica en sustancias como glucosamina, condroitín sulfato, ácido hialurónico, colágeno y sulfato de glicoproteína. Actualmente, las membranas de cáscara de huevo se usan especialmente en cosmética, medicina y en la industria farmacéutica. Las nuevas tecnologías admiten la separación efectiva de las membranas de la cáscara; esto hace que se puedan aislar y obtener los compuestos activos de la membrana⁷.

Existen, dentro de las ventajas de utilizar en esta investigación las membranas de cáscaras de huevo, específicamente las testáceas, que estas son un biomaterial natural y un tejido conectivo que están entre la clara y la cáscara de huevo; asimismo, son biocompatibles con células humanas y fáciles de adquirir a bajo coste. La característica red porosa de la estructura les suministra, a las membranas de la cáscara de huevo, una gran superficie para la deposición de biomoléculas y una porosidad apropiada para gas e intercambio de agua, que son factores fundamentales para vendajes para heridas⁹.

La membrana que está presente en las cáscaras de huevo de gallina se ha propuesto para distintas formulaciones como humectantes, para la curación de heridas usando una línea celular de queratinocitos humanos, para el tratamiento de las arrugas, así como también en la actividad antimicrobiana. Y se ha determinado que las cáscaras de huevo se pueden utilizar para materiales de productos cosméticos funcionales, porque ayudan a eliminar las arrugas que han sido causadas por la radiación UV-B².

Como bien se ha dicho, la cantidad de colágeno con fibras elásticas y la reparación del tejido conectivo con el paso de la edad se reduce, más que todo en la hidratación de la piel. El ácido hialurónico, por ser hidrófilo, realiza un papel biológico en el establecimiento de volumen y lubricación de la estructura intracelular; la concentración de este en la piel decrece con el envejecimiento, dando así una disminución de la elasticidad y la capacidad de retener agua en la piel; entonces provoca que se disminuya el volumen de la dermis y hace que exista una fuerte predisposición a la formación de arrugas y laxitud de la piel en la piel, particularmente en la piel del rostro¹⁰.

Es importante mencionar que actualmente en Costa Rica no existen estudios o investigaciones, en sí, que relacionen la extracción del ácido hialurónico con las membranas testáceas de las cáscaras de huevo; ante esta situación, solamente existen acerca de usos e importancia de este componente. Es por esto por lo que se ve reflejada la necesidad del porqué investigar sobre este tema, efectuando un nuevo conocimiento y aporte a la sociedad, a la Universidad Internacional de las Américas, al ser este de suma relevancia, relacionado con la salud y que muchas personas no tienen el conocimiento; además, la ventaja de que el material donde se puede extraer es de muy bajo costo¹¹.

1.4 Antecedentes

1.4.1 Antecedentes Históricos

Heaney *et al.*¹² (1976), con el título “The isolation and characterisation of hyaluronic acid in eggshell”, analizaron la parte orgánica de la cáscara de huevo de la gallina, donde encontraron que contenía una serie de proteínas y polisacáridos, eventualmente presentes como glicoproteínas y glicosaminoglicanos. Esta investigación se realizó mediante una preparación purificada de un glicosaminoglicano, por estudio de la velocidad de sedimentación y hasta el equilibrio en un gradiente de densidad. Se concluye que los productos de degradación manifestaron que los glicosaminoglicanos eran hialuronidasas y la identificación de los productos de degradación reveló que el glicosaminoglicano era ácido hialurónico.

Guerra *et al.*¹³ (1998), en su trabajo “El ácido hialurónico y sus aplicaciones en dermatología”, indicaron lo importante que se ha vuelto el ácido hialurónico ya que la literatura médica tiene un mayor auge en cuanto a este tema. Mencionan que el ácido hialurónico fue nombrado así por Meyer y Palmer en 1934 en el tejido que se aisló del cuerpo vitro del ojo bovino y del ácido urónico. Llegaron a su principal conclusión de que el ácido hialurónico tiene un papel importante en la curación de heridas, en la cicatrización y en el tratamiento del envejecimiento cutáneo.

Long *et al.*¹⁴ (2004), en su documento llamado “Preparation of hyaluronic acid from eggshell membrane”, detallaron las composiciones y métodos para preparar formulaciones que incluyen ácido hialurónico procedente de la membrana de la cáscara de huevo. Este hallazgo se dirigió a un método de tratamiento de un mamífero, que se favorecerá de la administración de ácido hialurónico, que incluye administrar una composición que contiene ácido hialurónico derivado de la membrana de la cáscara de huevo, donde se obtuvo que las composiciones pueden tener ácido hialurónico puro o ácido hialurónico en combinación con otros componentes naturales, resultantes de la membrana de la cáscara de huevo.

1.4.2 Antecedentes Internacionales

Oba *et al.*¹⁵ (2013), en “Collagen hydrolysate intake improves the loss of epidermal barrier function and skin elasticity induced by UVB irradiation in hairless mice”, desarrollaron esta investigación mediante la administración de colágeno hidrolizado por vía oral a ratones en una dosis o dosis repetidas, exponiendo a estos a los rayos UV-B. Como resultados, en una irradiación provocó una disfunción de la barrera epidérmica, incremento en la pérdida de agua transepidérmica, hiperplasia epidérmica y una disminución en el contenido de agua del estrato córneo. La irradiación repetida disminuyó la elasticidad de la piel y el contenido de ácido hialurónico dérmico en ratones. Y se concluyó que la administración de hidrolizado de colágeno altera la función de barrera epidérmica y elasticidad cutánea dérmica.

Urbano¹⁶ (2015), en su estudio titulado “Extracción a escala de laboratorio del complejo de proteínas presentes en las membranas intersticiales de residuos de cáscaras de huevo de gallina (*Gallus Domesticus*) mediante el proceso de hidrólisis alcalina”, extrajo el complejo proteico en las membranas intersticiales de residuos de cáscara de huevo de gallina, donde se realizaron análisis de caracterización en las fases proteica y mineral. Ahí se determinó que las membranas intersticiales son una fuente significativa de proteína, en comparación con la fase mineral, que alcanza altas concentraciones de calcio.

Yoo *et al.*² (2015), en su publicación “Effects of eggshell membrane hydrolysates on UVB-radiation-induced wrinkle formation in SKH-1 hairless mice”, examinaron el resultado de los hidrolizados de membrana de cáscara de huevo en la protección contra las arrugas, los rayos UV y la humedad para su utilización en cosméticos. Esto lo hicieron mediante un estudio donde se fraccionaron los hidrolizados, donde cada muestra se trató a diferentes concentraciones y se usaron ratones sin pelo, que habían sido expuestos a rayos UV-B para inducir arrugas durante siete semanas. Se logró determinar que la Fracción I fue más eficaz y que estos hidrolizados ayudan a atenuar las arrugas que fueron provocadas por radiación UV-B.

Chan *et al.*⁸ (2016), en su investigación “Utilización de la yema y clara liofilizada y cáscara pulverizada del huevo de gallina para la fabricación de una línea cosmética con

fin de cuidado de la piel”, realizaron un análisis de tres formulaciones cosméticas usando las partes que conforman el huevo de gallina como ingredientes activos para evaluar las propiedades beneficiosas. Se concluye que la línea cosmética a base de huevo cumple con el estudio de aceptabilidad de uso, evidenciando las funciones cosméticas.

Monferrer *et al.*¹⁷ (2016), en “Método de obtención de un producto cicatrizante y producto cicatrizante obtenido” elaboraron un procedimiento para la obtención de un producto cicatrizante, donde este producto cicatrizante está compuesto por un hidrolizado de membranas testáceas de huevo, que alcanza el $70\% \pm 5\%$ de proteínas de peso molecular y otros productos propios de las membranas testáceas, como lo son el ácido hialurónico, condroitín sulfato y glucosamina. Con esto se demostró el procedimiento para realizar esta formulación, y la que fue patentada.

Santa *et al.*¹⁸ (2017), en su artículo “Estrategias antienvjecimiento”, hicieron una revisión de aquellos agentes tópicos que son más utilizados, métodos químicos, materiales de relleno, dispositivos de luz, entre otros, para identificar los diferentes mecanismos por los cuales ocurre el envejecimiento cutáneo y las maneras antienvjecimiento, con las que la medicina cuenta actualmente para combatir esta problemática. Se obtuvo que el envejecimiento de la piel no solo se trata de estética o de algo superficial, sino que puede afectar la calidad de vida de los pacientes.

Cocul’ová *et al.*⁷ (2018), en “Isolation of the hyaluronic acid from the eggshell membranes”, elaboraron una investigación sobre el aislamiento del ácido hialurónico de las cáscaras de huevo, donde se realiza mediante métodos químicos y enzimáticos teóricamente, donde la hidrólisis química podría efectuar en etanol con HCl añadido, en solución de acetato de sodio, entre otros; mientras que la hidrólisis enzimática se podría emplear utilizando diferentes enzimas. En este artículo se usó el procedimiento mediante hidrólisis enzimática con pepsina, y se demostró que este método es eficaz para su separación.

Kalman *et al.*¹⁹ (2019), en “The effect of oral hydrolyzed eggshell membrane on the appearance of hair, skin, and nails in healthy middle-aged adults: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial”, realizaron un estudio y en las 12 semanas se valoró

el ácido hialurónico de administración oral 120 mg al día y su efecto sobre las arrugas, en donde se halló en la octava semana que los participantes seleccionados al azar del grupo, consiguieron progresos significativos en las arrugas de la piel o las comúnmente llamadas patas de gallo, por el efecto de humedad que tiene el hialuronato en la piel humana. Se consumó que la suplementación oral se asocia con un importante cambio en la apariencia de la piel y el cabello.

1.4.3 Antecedentes Nacionales

Se realizó una búsqueda en la biblioteca de la Universidad Internacional de las Américas (UIA), y asimismo en la base de datos “Kimuk”. Lastimosamente, no se encontró ninguna relación con el ácido hialurónico ni con las membranas testáceas presentes en las cáscaras de huevo. También se investigó acerca de este tema en revistas indexadas y de fuentes confiables, así como en BINASSS, que es el ente responsable de proveerles información científica técnica, relacionada con la salud y la seguridad social a los funcionarios de la Caja Costarricense de Seguro Social, en beneficio de la población costarricense, y lamentablemente tampoco se encontró nada a nivel nacional. No obstante, sí se encontraron artículos en Costa Rica que no competen a este apartado, pero sirven para el desarrollo de la investigación.

1.5 Proyecciones

- Se pretende extraer el ácido hialurónico de las membranas testáceas presentes en las cáscaras de huevo, para lograr su cuantificación e identificar sus características fisicoquímicas en el laboratorio de la Universidad Internacional de las Américas en los años 2021-2022.
- Generar conocimiento sobre cómo extraer el ácido hialurónico desde la perspectiva de que se puede usar materia prima de productos de uso común o de fácil acceso como lo son las cáscaras de huevo.
- Se realizará un aporte para futuras investigaciones, e incentivar para que se pueda crear alguna formulación farmacéutica de interés en cuanto a los beneficios que posee el ácido hialurónico, dando con esta investigación herramientas para lograrlo.

CAPÍTULO II- MARCO TEÓRICO

En este apartado se muestran elementos teóricos conceptuales que son imprescindibles para la correcta comprensión de la investigación que se presenta. Algunos conceptos clave que se desarrollan son: huevo de gallina y todos sus elementos constituyentes, los beneficios, vitaminas, proteínas y usos del huevo de gallina; los cosméticos de diferentes orígenes, cómo separar proteínas y extraerlas, conceptos relacionados con el ácido hialurónico, entre otros que tienen relevancia en esta investigación. Todo ello resulta sumamente importante para poder entender cómo se lleva a cabo el proceso de extracción.

2.1 Industria cosmética y cosmeceúticos

En el siglo XX, la industria cosmética fue fundada por químicos y farmacéuticos y que actualmente genera miles de millones de dólares de manera anual. De forma global, se podría decir que a finales de la II Guerra Mundial los cosméticos generaron mayor impacto en la sociedad. Sin embargo, desde la Antigüedad se ha practicado el uso de estos productos, por ejemplo, los ungüentos y plantas, estos a base de aceite de castor, belladona, mostaza, aloe vera, entre otros²⁰. Se sabe que los cosméticos se han utilizados desde muchas décadas atrás por egipcios, griegos y romanos, y estos se definen según la reglamentación como:

...toda sustancia o preparado destinado a ser puesto en contacto con las diversas partes superficiales del cuerpo humano (epidermis, sistema capilar y piloso, labios, uñas, órganos genitales externos; o con los dientes y mucosa de la cavidad bucal), con el fin exclusivo o principal de limpiarlas, perfumarlas, modificar su aspecto y/o corregir los olores corporales y/o protegerlas o mantenerlas en buen estado²¹.

Además, las personas siempre de forma empírica han utilizado los recursos naturales para cuidar la piel y su aspecto, estableciéndose en sus conocimientos etnobotánicos. En los últimos años se ha interesado más por los cuidados de la piel en general y que se encuentre en un estado saludable, esto de forma exponencial, lo que ha obligado a subir las demandas de extractos vegetales que demuestren su selectividad y eficacia²⁰.

Para que se le pueda llamar a un producto como cosmético, su acción debe ser superficial, donde los componentes que lo constituyen no deben penetrar interiormente, es decir, no tener una acción sistémica. Por lo tanto, todos los dispuestos a la prevención, diagnóstico y tratamiento de patologías, así como también los preparados a ingerirse, inhalarse, inyectarse o que sean para implantación en el cuerpo humano, quedan fuera de esta categoría de cosmetología²¹.

Por otro lado, existe una definición importante de definir lo que es el cosmecéutico, debido a que ha sido la combinación de cosmético y de farmacéutico; este describe una categoría de aquellos productos del cuidado de la piel que suministran beneficios terapéuticos; esto quiere decir que son preparaciones tópicas que se venden como cosméticos, pero poseen acción farmacológica. Es por esto por lo que, debido a la evolución de la industria cosmética, los cosmecéuticos se van relacionando más con los profesionales médicos dermatólogos, con el fin de promover una piel saludable²².

2. 1.1 Cosméticos de origen natural

Para iniciar, se debe aclarar que “todo producto de cosmética orgánica, si es verdaderamente orgánico, debe llevar un certificado de un organismo regulador que lo acredite como tal”²³. En Costa Rica, no existe una organización o programa que brinde dichos certificados, como sí las hay en Francia, Italia y otros países. Quizá uno de los países desde el cual se genera más importaciones en cosméticos es Estados Unidos de América, pues este país cuenta con la USDA, que posee un Programa Nacional Orgánico (NOP), que es la entidad que les brinda dicho certificado a las empresas estadounidenses. Algunas de las etiquetas que brinda el NOP son:

100 por ciento orgánico: el producto debe contener (excluyendo agua y sal) sólo ingredientes producidos orgánicamente.

Orgánico: el producto debe contener por lo menos 95% de sus ingredientes de producción ecológica (excluyendo agua y sal). Los ingredientes restantes deben consistir en sustancias no agrícolas aprobadas en la Lista Nacional o de producciones agrícolas orgánicas.

Hecho con ingredientes orgánicos: el producto contiene al menos un 70% de ingredientes orgánicos, y la etiqueta del producto puede incluir hasta tres de los ingredientes orgánicos en la etiqueta principal²⁴.

En los últimos años se ha logrado ver una tendencia por parte de las personas que utilizan cosméticos por aquellos productos que, en su formulación, sean a base de ingredientes naturales, y también en otras áreas en las que se puedan utilizar, como Medicina o Farmacia⁸. Esta tendencia por el uso natural también está permeada por el uso de cosméticos en los que no haya testeos en animales, apoyada en el veganismo. Si bien es cierto que el uso de huevo de gallina es contrario a la corriente de veganismo, quizá la extracción de ácido hialurónico que propone esta tesis sea más compatible con tendencias que están en contra del maltrato y del testeo en animales.

Es debido a esto, que este tipo de mercados, en las grandes compañías de cosméticos y en el mercado naturista, va en un crecimiento exponencial. Estos bienes o productos mueven la moda a volver a aquello que es básico y, a la vez, engrandecen la belleza, y en cierta forma están acompañados por un beneficio biológico funcional⁸. Muchos de los eslóganes de estas compañías con énfasis naturalista se apoyan en el principio de la belleza natural, es decir, el uso no excesivo de cosméticos y maquillaje.

Asimismo, es importante aclarar que el beneficio biológico funcional va más allá de los usos cosméticos⁸. Como se mencionaba en el primer párrafo de este apartado, algunas áreas del conocimiento, como la Medicina, han hecho uso de elementos naturales como el ácido hialurónico que, en principio, fueron pensados para la cosmética en aspectos como la cicatrización, los tratamientos periodontales, la artritis, entre otros. Debido a ello, se denota cómo la Medicina y otras áreas del conocimiento se nutren entre sí.

Finalmente, de acuerdo con Mosquera²⁴, investigadora de la Universidad Politécnica Salesiana de Ecuador, menciona que: “un producto natural u orgánico da seguridad, genera confianza al estar relacionado con la ausencia de componentes sintéticos”. Cada día, más y más personas se muestran renuentes al uso de productos sintéticos, debido a que se desconocen los efectos secundarios que estos productos pueden tener en el organismo. Es evidente que un producto natural también puede traer efectos secundarios nocivos; sin

embargo, las estadísticas demuestran que es mucho menor la proporción de estos en los productos naturales.

2.1.2 Cosméticos de origen animal

En principio, “los cosméticos de origen animal son todos aquellos cuyo principio activo proviene de fuentes animales, los ingredientes de origen animal son autorizados y sometidos a restricción conforme a las listas nacionales e internacionales de las especies protegidas o peligrosas”⁸. Como se mencionaba en el apartado anterior, actualmente, hay una fuerte tendencia de rechazo a la utilización de estos productos por la consciencia de no maltrato a los animales, que va en incremento mundial. Sin embargo, hay muchos productos de origen animal con usos médicos o cosméticos que no han sido sustituidos aún por algún producto orgánico; tal es el caso de la lanolina.

Por otro lado, existen algunos atenuantes que han provocado mayor reticencia de origen animal; por ejemplo, “durante la crisis de las «vacas locas» (EEB), la «gripe aviar» (virus H5N1) y otras epizootias, se introdujo en el subconsciente colectivo la idea de que los productos de procedencia animal podían ser especialmente dañinos”²⁰. Lo anterior, en unión con la consciencia de no maltrato animal, ha provocado la caída de consumo de productos de origen animal.

Debido a ello, se ha dado un giro hacia la mirada de la cosmética verde o natural, que es procedente de las plantas, ya que se supone que estos productos no generan ningún daño en comparación con los de origen animal²⁰. Esto no es completamente cierto porque, también, se pueden tener reacciones alérgicas a productos naturales; sin embargo, dichas reacciones son proporcionalmente menores en comparación con productos de origen animal o sintéticos.

También, existen algunos productos de origen animal que poseen mayor aceptación en el marco de esta nueva tendencia de consciencia verde. Tal es el caso del uso de la cáscara de huevo, que es utilizada como exfoliante en conjunto con otros productos como cubiertas de moluscos, tierras de diatomeas o polvo de perla²⁵. Para la comunidad vegana, el uso de estos productos como exfoliantes es inadmisibles, pues pueden ser sustituidos por otros de origen 100 % de origen orgánico.

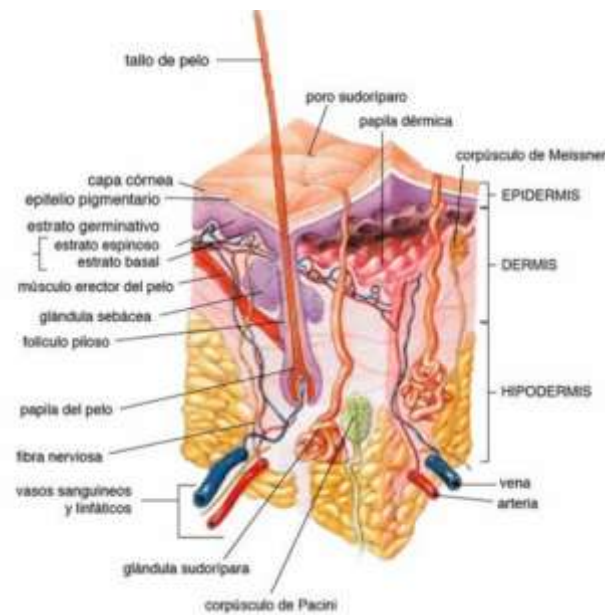
Finalmente, cabe aclarar que, debido a esta nueva tendencia de consciencia verde y no maltrato animal, los textos académicos recientes más bien mencionan empresas y políticas que reaccionan en contra de la experimentación, el testeo y el uso de productos de origen animal. Por esta razón, este apartado es de menor extensión, en comparación con el anterior de cosméticos de origen natural.

2.1.3 Envejecimiento de la piel y el uso de cosméticos

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano, midiendo cerca de dos metros cuadrados y con un peso de cuatro a cinco kilos, este cumple ciertas funciones en el organismo, como, por ejemplo: siendo una barrera protectora contra factores externos, mecánicos, químicos y físicos. Posee tres compartimentos primordiales: epidermis, dermis e hipodermis (Ver Figura 1). Muchas veces a la piel no se le brindan los cuidados y la

Figura 1. Anatomía de la piel humana

relevancia adecuada, y como resultado provoca que su apariencia se afecte¹.



Fuente: Martínez¹

El proceso del envejecimiento cutáneo se refiere a un fenómeno que sucede de manera normal biológicamente y es inexorable. Pueden hallarse dos tipos de grupos de

envejecimiento, primeramente, el que se suele deberse al efecto de la debilitación de la labor celular como resultado del transcurso normal de envejecimiento, a este tipo se le llama envejecimiento intrínseco; por otro lado, cuando se van aglomerando todos aquellos efectos perjudiciales a causa de la exhibición a diferentes elementos nocivos que son externos, se le llama envejecimiento extrínseco²⁶.

Estos factores del envejecimiento, tanto intrínsecos como extrínsecos, operan de manera conjunta, provocando un sinergismo que potencia la incitación a modificaciones en la piel de las personas que se pueden caracterizar en manifestaciones clínicas como, por ejemplo: quemaduras, eritema, hiperpigmentación, telangiectasias, resequedad de la piel o flacidez en la misma, arrugas que se pueden observar acentuadas, variaciones en la textura o hasta cáncer de piel. Los mecanismos moleculares de estos dos tipos de factores son muy parecidos entre sí²⁶.

El proceso de envejecimiento de la piel es una problemática complicada; se dice que es un instintivo de lo que les ocurre a los órganos internos, y recientemente se le ha prestado más atención en los últimos años, a causa del incremento en la perspectiva de vida. Las personas en su mayoría quieren que su piel tenga un aspecto joven y saludable, porque esto conlleva a grandiosos beneficios psicológicos; igualmente, hablar del envejecimiento no solamente está relacionado con la apariencia física, ya que del mismo modo tiene implicaciones médicas, porque una piel arrugada no funciona adecuadamente como barrera, tiene alteraciones en la cicatrización y predispone a diversas patologías²⁷.

Existen diferentes factores como la exposición ambiental y la luz solar ultravioleta (UV), que se relacionan altamente con el cambio progresivo del aspecto del cabello, la piel y las uñas como parte del proceso del envejecimiento. Esto se le atribuye al envejecimiento normal intrínseco y extrínseco, cuando hay diversas alteraciones; por ejemplo, conforme avanza la edad en la dermis la densidad de colágeno se reduce, y esto provoca una disminución en el espesor dérmico¹⁹.

Esto no solo ocurre con la dermis o la piel, sino que también semejantes transformaciones perjudican el cabello y su apariencia en cuanto, a brillo, grosor, plenitud, entre otros, y más concretamente, los cambios que se dan molecularmente van a modificar

la estructura de la fibra capilar; además, reducen la producción de melanina y se da una prolongación de la fase telógena del ciclo del cabello, y en consecuencia acontece la alteración del cabello en su apariencia y salud¹⁹.

A causa del envejecimiento, también se puede sumar la alteración en el aspecto de las uñas de las personas, ya que puede verse afectado esto con respecto al grosor, el contorno, la superficie, y color de las uñas. En consecuencia, en la actualidad, muchas empresas e industrias de la cosmética y salud tratan de subsanar o reparar, y hasta restablecer, todas esas incomodidades que le resultan fastidiosas a la población. Conforme la edad va avanzando y la vejez se va acercando, estas acciones compensadoras son codiciadas por los consumidores y acuden a intervenciones en la dermatología cosmética, y a productos de venta libre y suplementos¹⁹.

Las estrategias que se han estudiado para retrasar el proceso de envejecimiento se basan en las diversas teorías que existen sobre este. Una de las trascendentales es la teoría de los radicales libres/inflamación; esta indica que la retención de radicales de oxígeno produce oxidación de elementos endógenos, y esto origina el envejecimiento. De igual modo, la inflamación lleva a la sobreproducción de sustancias reactivas con daño tisular²⁷.

Otra de las teorías se refiere a las mutaciones somáticas y a la regulación génica, donde afirma que la aglomeración de mutaciones genéticas y transformaciones en la expresión génica conducen a la senescencia³⁰, a la que también se le conoce como envejecimiento natural, determinado por factores fisiológicos y predisposición genética²⁶. Existe otra teoría, la mitocondrial, donde presenta que fallas en las vías metabólicas dirigen a reducir la producción energética, y esto hace que ocurra una alteración celular²⁷.

Por otra parte, la teoría del telómero garantiza que el encogimiento telomérico causa que exista un número restringido de divisiones celulares, produciendo que haya una detención de proliferación celular. También se encuentra la teoría inmune, esta implica fundamentalmente al sistema inmunológico, a quien se le asigna como responsable de controlar el proceso de envejecimiento, y que la alteración en su función hace que ocurran cambios incompatibles con la vida, como ciertos tipos de cáncer²⁷.

Finalmente, la teoría neuroendocrina sostiene que irregularidades en el eje hipotálamo pituitario adrenal provocan un perjuicio en la homeostasis del cuerpo, disminuyendo la habilidad de sobrevivir. La única estrategia que mencionan estos autores, la cual ha justificado extender la vida, es la restricción calórica. Esto induce a una disminución de la incidencia de diabetes, cataratas, enfermedad cardiovascular y renal. Se entiende que un 2%, aproximadamente 1029 de los genes, modifican su expresión con el envejecimiento²⁷.

Cabe la posibilidad de que estas teorías vayan a interrelacionarse en el proceso final de envejecimiento natural, determinado por factores fisiológicos y predisposición genética. Como se mencionó anteriormente, existen factores tanto extrínsecos como intrínsecos que influyen desfavorablemente en este proceso biológico complejo. Dentro de los factores intrínsecos se puede mencionar aspectos genéticos, hormonales y metabólicos. Mientras que los factores extrínsecos comprenden la radiación ultravioleta (UV) (que contribuye hasta en 80% al proceso del envejecimiento), la polución, la radiación ionizante, el tabaquismo, los patrones de sueño, la posición al dormir, así como el uso de químicos y tóxicos²⁷.

El fumado, las sustancias contaminadoras de los autos, la ingesta de bebidas alcohólicas, los hábitos dietéticos, los desechos industriales y la forma del estilo de vida de las personas, entre otros factores, pueden cooperar al envejecimiento. El sol o fuentes artificiales que producen radiación ultravioleta (UVR) poseen una consecuencia dañina en las funciones de la piel y la persistencia de los queratinocitos, llamada fotoenvejecimiento²⁶.

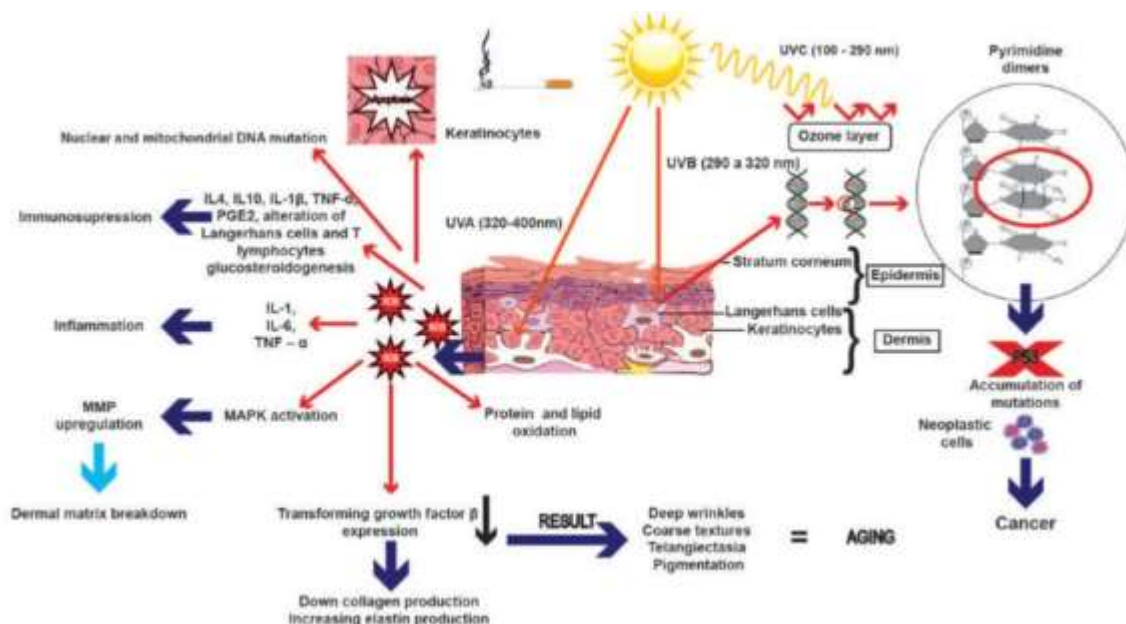
En cuanto a lo que respecta al espectro de radiación de la luz solar, esta se constituye de tres tipos diversos de radiación UV, los cuales son:

UVC (100-290 nm), que está bloqueada en gran medida por la capa de ozono y, por lo tanto, tiene poco impacto en la piel; UVB (290-320 nm), que penetra principalmente en la epidermis (estrato córneo) y es responsable del eritema asociado a una quemadura solar, y UVA (320-400 nm), que penetra en la dermis, y tiene el papel principal en las lesiones crónicas. daño de la piel Estos tipos de

radiación representan alrededor del 10 % de la radiación solar total que llega a la atmósfera. Por otro lado, la luz visible (400-780 nm) y la radiación infrarroja (780-1400 nm), que representan alrededor del 40 % y el 50 % de la radiación total que emana del sol, respectivamente, también son factores importantes en el fotoenvejecimiento, porque puede ejercer efectos nocivos cutáneos, tanto agudos como crónicos²⁶.

Como bien se ha demostrado, el fumado se relaciona intensamente con una inadecuada cicatrización de heridas, también se asocia a algunos carcinomas de células escamosas, cáncer oral, exacerbaciones de psoriasis y envejecimiento anticipado de la piel. Este deterioro cutáneo provocado por el tabaco se ha vinculado con el estrés oxidativo, transformación de la biosíntesis de colágeno y en la activación de las metaloproteinasas que están en la matriz. En la Figura 2 se muestran los acontecimientos más importantes del proceso inducido por los rayos UVA, UVB y el tabaquismo²⁶.

Figura 2. La radiación ultravioleta y el tabaquismo afectan la estabilidad del ADN, causando alteración en la estructura de la molécula debido a la formación de mutaciones que se acumulan y promueven la transformación celular maligna



Fuente: Mesa²⁶

Conforme van pasando los años en las personas, el envejecimiento hace que los fibroblastos vayan decreciendo su capacidad de generar ácido hialurónico, y al mismo tiempo hacen que la poca cantidad de ácido hialurónico que se forma sea de un peso molecular bastante bajo, repercutiendo de manera negativa, ya que se pierde aquel efecto deseado del mismo como hidratante. Además, el aumento de los radicales libres en el organismo también hace que ocurra más rápido la destrucción molecular de tan importante sustancia⁴.

Otra consideración, es que el ácido hialurónico es bastante sensible a las enzimas ya mencionadas, las hialuronidasas. Es debido a esta causa que la vida media del ácido hialurónico natural sea de tres minutos aproximadamente y hasta podría durar a las dos o tres semanas. Alrededor de un tercio del total del ácido hialurónico presente en el cuerpo humano se reemplaza de manera cotidiana⁶.

El ácido hialurónico se encuentra de forma exuberante en los tejidos fetales, pero conforme pasa el tiempo y se va creciendo en el desarrollo, se va sustituyendo poco a poco de manera parcial por fibras de colágeno y proteoglicanos; de esta manera los tejidos maduros pueden desempeñar labores mecánicas más precisas. Por ejemplo, los autores mencionan:

(...) la cuerda vocal del recién nacido está compuesta por un tejido conectivo laxo rico en HA. A medida que las cuerdas vocales se desarrollan y maduran, el contenido de HA se reduce y las proteínas fibrosas se depositan a través de la lámina propia en forma de gradiente. En general, la HA es indispensable para el desarrollo y la maduración de las cuerdas vocales y su presencia en las cuerdas vocales es beneficiosa desde el punto de vista evolutivo para que el tejido haga frente al trauma constante²⁸.

La cosmética antienvjecimiento se podría planear tanto para la prevención para retrasar las expresiones del envejecimiento de la piel como también para la reparación, con el fin de mejorar el estado de la piel envejecida. Si se habla del tratamiento preventivo, la manera es tener una buena hidratación en la epidermis, protegerla de radicales libres y de la radiación solar²⁹.

Para conseguir la hidratación epidérmica se podrían usar: “proteínas y ceramidas de cadena corta y ácidos grasos libres, ceramidas y derivados del colesterol”. Luego de obtener la hidratación se debe aplazar la regresión de la dermis manteniéndola joven, para esto se pueden utilizar incitadores celulares como lo son los extractos de centella asiática y timo, vitamina C, vitamina A, ácido pantoténico y fibronectina; se debe demarcar la dosis a utilizar para mayor efectividad²⁹.

Por ejemplo, si se habla de vitamina C, su mecanismo de acción es la hidratación para la prevención del envejecimiento. Resumidamente este compuesto actúa en la síntesis de colágeno por parte de los fibroblastos, y también posee un efecto protector contra la radiación UV. Por otro lado, otro ejemplo es el ácido pantoténico (vitamina B5), que se utiliza como emoliente, ayudando también a la estimulación de los fibroblastos, y el efecto es mayor al relacionarse con vitamina C²⁹.

Con respecto a la cosmética reparadora, su objetivo es recuperar los tejidos lesionados utilizando fibronectina o reparador del ADN que interviene a nivel molecular para subsanar los procesos donde las moléculas han sido afectadas por radicales libres. Para esto, existen constituyentes formados por colágeno, como los proteoglicanos, las glicoproteínas, la fibronectina, entre otros. Los proteoglicanos, por ejemplo, son un componente importante en la matriz extracelular animal, se dice que es la sustancia que rellena los espacios entre las células, y es debido a sus cadenas de polisacáridos hidrofílicas suelen a ocupar grandes volúmenes en relación con su masa²⁹.

2.1.4 Cosméticos a base de huevo

En la actualidad, están en el mercado cosméticos que se fabrican a base de huevo, debido a lo que sus nutrientes pueden contribuir; un ejemplo de ello es la yema, que por su contenido graso hace que sea excelente para el tratamiento del cabello y piel seca o maltratada. El aceite de huevo como un excipiente puede utilizarse en muchas formulaciones cosméticas como cremas, ungüentos, protectores solares o lociones, operando como un emoliente, humectante, antioxidante, potenciador de la penetración, acondicionador de la piel oclusiva y antibacteriano. Asimismo, se pueden efectuar tratamientos para el cabello²⁵.

Como puede verse, el huevo de gallina posee una muy grande versatilidad, lo cual provoca que su uso se pueda dar en muy distintas formas. Asimismo, las vitaminas, proteínas y minerales que posee provocan que sea un producto orgánico muy apetecido en la industria de cosméticos, aunque su uso no se ha ampliado tanto en esta área⁸. Además, otro punto muy a favor del huevo de gallina es el hecho de que es un producto de bajo costo. Debido a todos los beneficios mencionados, se encuentran algunas investigaciones que proponen la confección de toda una línea cosmética a base de huevo, y tal es el caso de la investigación de Chan *et al.*⁸ (2016):

Esta investigación se pretende fabricar una línea cosmética facial a base de huevo conformado por un gel de limpieza con propiedades exfoliantes a base de cáscara de huevo pulverizada, una solución tónica a base de clara de huevo liofilizada y una crema con acción humectante a base de yema de huevo liofilizada⁸.

Por otro lado, de forma natural y casera el huevo es usado con fines cosméticos. Por ejemplo, el limón tiene un efecto más potente cuando se usa con el huevo para cerrar los folículos de la piel⁸. Este efecto del cierre de los folículos provoca que la piel tenga un efecto más liso y sedoso, lo cual, a su vez, brinda una visión de piel joven y natural. Es decir, no solamente las grandes compañías de cosméticos explotan los beneficios del huevo, sino que son de conocimiento general muchos de los diferentes usos que les pueden dar al huevo.

2.1.4.1 Beneficios de la clara de huevo sobre la piel

Las proteínas que contiene el huevo ayudan a suavizar y mejorar la piel, además se ha usado en preparaciones tradicionales en conjunto con otros materiales vegetales para la sinergia del efecto tónico sobre la piel⁸. Este uso de la clara del huevo se da tanto en la industria de cosméticos como en usos caseros. Existen numerosas formas en las que la clara de huevo es utilizada como ingrediente base para formar tónicos y cremas hidratantes.

Un ejemplo de lo dicho anteriormente es que la clara de huevo se puede utilizar de manera simultánea con la pulpa del tomate, y esta mezcla funciona como tónico. Algunos beneficios de este tónico 100 % natural es que reduce la problemática que tienen las pieles

grasas o mixtas⁸. Muchas personas alrededor del mundo sufren efectos negativos sobre su piel debido al exceso de grasa; por lo tanto, un tónico como el descrito resulta sumamente atrayente para quienes sufren por esta condición dérmica.

Por otro lado, también son múltiples los agentes que pueden ser extraídos de la clara de huevo, uno de ellos es la albúmina. Este “es un agente espesante que da a los cosméticos una consistencia adecuada para ser aplicada a la piel o el pelo. Este ingrediente se deriva generalmente de la clara de huevo”⁸. Además de ser un agente espesante, también son conocidos los efectos regenerativos y reparadores que tiene la albúmina en la piel.

2.1.4.2 Beneficios de cáscara de huevo sobre la piel

En primer lugar, en la cáscara del huevo se hallan una cantidad extensa de proteínas que pueden tener diversas utilidades sobre la piel; no obstante, a causa de que estas proteínas se localizan en muy pocas cantidades, sus aplicaciones aún están siendo estudiadas. Sumadas a esto, existen algunas proteínas que se encuentran en la membrana testácea o intersticial, que se pueden emplear para el cuidado de la piel, y es por esto por lo que se está manejando en numerosos cosméticos⁸.

Actualmente, las cáscaras de huevo son vistas como desecho, debido a que se desconoce una manera práctica en la que se puedan extraer sus proteínas y demás nutrientes que se encuentran ahí. Sin embargo, ya existen algunas investigaciones^{8, 16, 24, 31, 32} que abogan por el uso eficiente de los beneficios del huevo en general y de la cáscara de huevo en particular. Dicho propósito también es el que se plantea en el presente trabajo investigativo.

En específico, la cáscara de huevo puede usarse como limpiador facial. “La cáscara de huevo a manera de micropartículas ha sido utilizada como producto cosmético, a manera de un agente de limpieza facial”¹⁶. Además, de forma popular, la cáscara de huevo también es utilizada por sus beneficios exfoliantes en la piel.

Finalmente, otro uso de la cáscara de huevo de gallina consiste en la elaboración de tiza. Si bien este uso no es específico para la piel, aporta el beneficio de que no tiene los

efectos nocivos de la tiza común sobre la piel. “De características similares a la tiza para dibujar en la pizarra, pero con la diferencia que no agrieta la piel como lo hace la tiza común”¹⁶.

2.1.4.3 Beneficios de la yema de huevo sobre la piel

Se sabe que la yema de huevo de gallina contiene muchos nutrientes, proteínas, vitaminas, por ejemplo, la vitamina A, y también contiene esteroides de lecitina; esto hace que se considere bastante a la yema como un producto o candidato para dar brillo, sobre todo, en pieles que son de aspecto seco y aquellas que son sensibles. De esta forma, se dice que la yema de huevo de gallina contiene ciertas cualidades o características de valor nutritivo que le brindan firmeza, suavidad e hidratación a la piel de las personas⁸.

Asimismo, “la yema de huevo concentra todos los compuestos con efecto beneficioso en su composición, como son los carotenos (luteína y zeaxantina), los ácidos grasos mono y poliinsaturados, y una inmensa cantidad de minerales y vitaminas”³¹. Con esto, se evidencia parte de los beneficios que la yema de huevo puede traer a la piel.

2.1.4.4 Reacciones adversas del huevo sobre la piel

Una de las reacciones adversas del huevo más importante es la alergia. En términos simples, esta consiste en

(...) una reacción adversa causada por un mecanismo inmunológico, que se produce por la ingestión y el contacto con huevo de gallina (el consumido habitualmente) u otras aves. Esta reacción se repite cada vez que se tiene un nuevo contacto con huevo, y ocurre solo en las personas que han producido anticuerpos (inmunoglobulinas) de clase IgE dirigidas contra las proteínas de huevo³³.

Por otro lado, es importante aclarar que no se considera una reacción adversa del huevo, el consumo de uno que esté en mal estado; esto ocurre “por contaminación del producto con bacterias, y se corresponden con fenómenos de tipo tóxico, con síntomas de diarrea, vómitos, fiebre y, en ocasiones, cuadros generales sépticos graves”³³. Evidentemente, el

consumo de huevo en mal estado provoca problemas gastrointestinales que no son importantes de mencionar en esta tesis.

Además, el cuadro que aparece en una alergia al huevo es de los comunes como en cualquier alergia a alimentos: “los síntomas más habituales son los que tienen lugar en la piel, con enrojecimiento, picor, urticaria (ronchas) alrededor de la boca o generalizada, e hinchazón (edema) de los labios y/o de los párpados”³³. Es evidente, que estos síntomas son bastante molestos, y se debe tener claridad de no tener alérgico al huevo en caso de que se quiera utilizar este de alguna otra forma.

Las partes del huevo de gallina que pueden inducir a una alergia son la clara o albumen y la yema, sin embargo, debido a la gran cantidad de proteínas que contiene la clara es el responsable de muchas alergias, se han logrado encontrar alrededor de 24 diversas proteínas que provocan alergia, las cuales poseen un nombre y un número específico, y estos pertenecen al nombre de la especie con las iniciales de *Gallus domesticus* (Gal d)³³.

2.2 Fisiología del huevo de gallina

Uno de los alimentos que ha sido muy utilizado en la industria alimentaria por contener gran cantidad de proteínas de alta calidad para el ser humano es el huevo de gallina, teniendo así un carácter nutricional completo, porque contiene todos los aminoácidos esenciales en las proporciones convenientes, que necesita el organismo para construir y subsanar las células de los músculos y otros tejidos corporales. Sumado a esto, el huevo de gallina es una fuente rica de ácidos grasos mono y poliinsaturados, vitaminas, minerales y colesterol; su costo es accesible, bajo contenido calórico y es fácil su preparación³⁴.

El huevo de gallina (*Gallus domesticus*) es un cuerpo de forma redonda u ovalada, con tamaños y dureza variables, que son procedentes de las hembras de aves en este caso, y que comúnmente se hace referencia a estos cuando se habla de un huevo, debido a que es el que principalmente en la vida cotidiana se consume con mayor frecuencia, pero pueden existir de distintas especies de animales que poseen el germen del embrión y las sustancias consignadas a su nutrición, mientras se da el proceso de incubación³⁵.

La estructura del huevo es compleja y procede de su función reproductiva, ya que en sí cumple la tarea de hospedar y alimentar al embrión en todo el proceso o tiempo que tarda la incubación; este dura aproximadamente un lapso de 21 días, y posteriormente se daría como resultado el nacimiento del nuevo individuo. Por otra parte, los huevos comerciales tienen una gran diferencia, pues estos no son fecundados y no tienen embrión, solamente poseen el óvulo (yema de huevo) que está cubierto por la clara, membrana y la cáscara³⁵.

Las gallinas ponedoras de huevos empiezan el proceso luego de las veinte semanas de desarrollo, y cada ovulación se realiza una vez cada veintiséis horas; esto quiere decir que normalmente sería un huevo al día, lo hacen entre las 7:00-11:00 de la mañana y posteriormente luego de unos 15 a 30 minutos se da nuevamente la ovulación. Para la producción de huevos la gallina no requiere ser fecundada; esto hace que en las granjas puedan efectuar sus actividades sin la necesidad del macho (gallo)³¹.

Según lo mencionado anteriormente, debido a que la gallina no necesita del gallo para producir huevos, pero sí necesitará que todos los componentes se puedan formar y que lo hagan de la mejor manera posible, entonces el factor que se ve relacionado con esto es el tipo de alimentación que se le da a la gallina, su entorno y el estado de salud de esta. Por otro lado, las características organolépticas, físicas y nutricionales son las que permiten diferenciar a los huevos de distintas especies, ya que estas son únicas entre ellas³¹.

En la formación de la cáscara de huevo, el organismo de la gallina debe hacer un esfuerzo fisiológicamente hablando, porque en un lapso de 21 a 23 horas los compuestos necesarios son sintetizados y llevados al lugar de formación característico en el oviducto (este es un órgano tubular que en su función está la formación del huevo por la exudación de los elementos que envuelven la yema), para seguidamente distribuirse apropiadamente en cuanto a secuencia, cantidad y su orientación. Existe un sistema reproductor con su respectiva función, y en la Figura 3 se pueden ejemplificar estas partes, el tiempo que lleva cada etapa de la formación¹⁵.

En una gallina sana, se esperaría que sus huevos sean estériles en el instante de su puesta y su composición, así como su estructura le da esa defensa eficaz ante los contaminantes microbiológicos. El sistema defensivo que tienen los huevos para evitar la

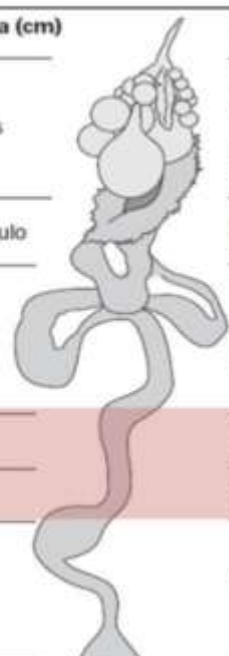
posible contaminación interna está constituido por barreras tanto químicas como físicas; casi siempre la contaminación de estos inicia luego de la puesta en el momento que los microorganismos que se encuentran en las cáscaras, debido al contacto con materia fecal del ambiente o del paso del huevo por el canal de la gallina, e intentan atravesar hacia su interior³⁶.

El poder romper sencillamente o la rotura frágil del huevo se debe a las propiedades estructurales y mecánicas de la cáscara, ya que la interacción de las fracciones, tanto orgánica e inorgánica, proporcionan como efecto un material de un grado inherente de flexibilidad con un comportamiento de quebrar fácilmente el huevo; algunas personas mencionan que la cáscara de huevo de gallina se puede definir como una biocerámica¹⁵.

Figura 3. Representación de la formación del huevo de gallina en el oviducto

Parte Anatómica (cm)		Funciones	Tiempo
Ovario	7 Folículos		
		Deposito de yema	10 días
	9 Infundibulo	Fecundación M. Vitelinas	20 min
Oviducto	33 Magno	Deposito Albumen	3 h 30 min
	10 Istmo	Membranas testáceas	1 h 15 min
	10 Útero	Hidratación Albumen Formación cáscara	21 h
	10 Vagina Cloaca	Ovoposición	1 h 30 min

De 24 a 26 horas



Fuente: Urbano¹⁶.

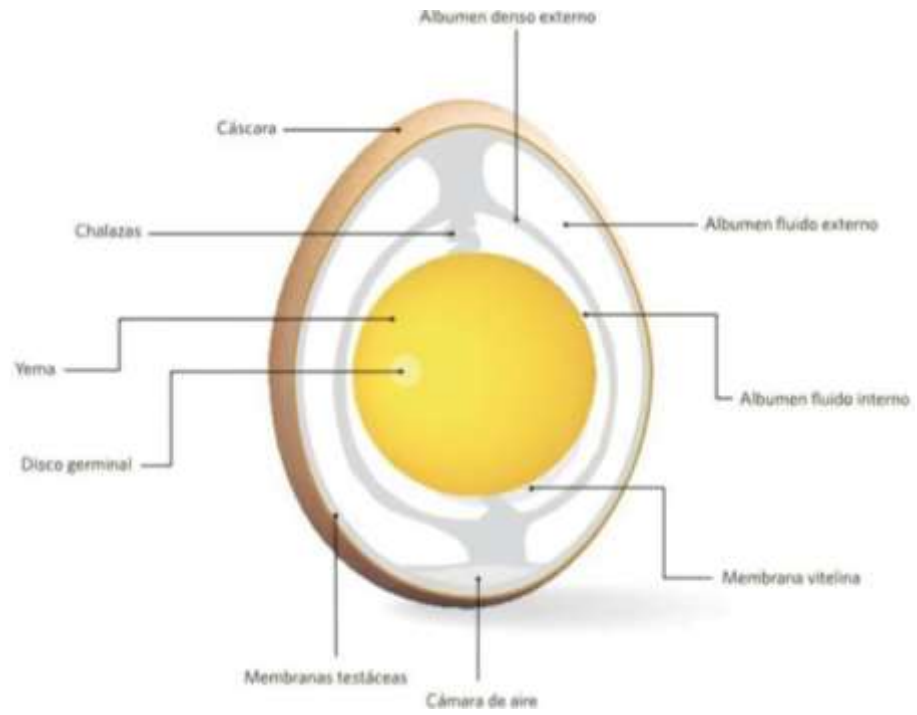
2.2.1 Partes del huevo

El peso promedio de un huevo de gallina es cercano a 60 g, donde el total de ese peso se encuentra dividido en sus partes, las cuales son clara, yema y cáscara; con valores de 60%, 30% y 10%, respectivamente. Las particularidades de cada estructura del huevo dependen de muchos factores, como el tipo de raza que sea la gallina, la alimentación, la técnica de crianza y las condiciones ambientales a las que esté expuesta la misma³⁶.

La estructura del huevo tiene como diseño, principalmente para poder ofrecer una protección adecuada al embrión hasta el momento donde ocurre el nacimiento del animal, o se vaya a abrir para su posterior preparación como alimento. Cada parte le brinda una función específica al huevo, ya sea de protección o conservación del contenido en sí del mismo y para el almacenamiento de los nutrientes que posee³⁶.

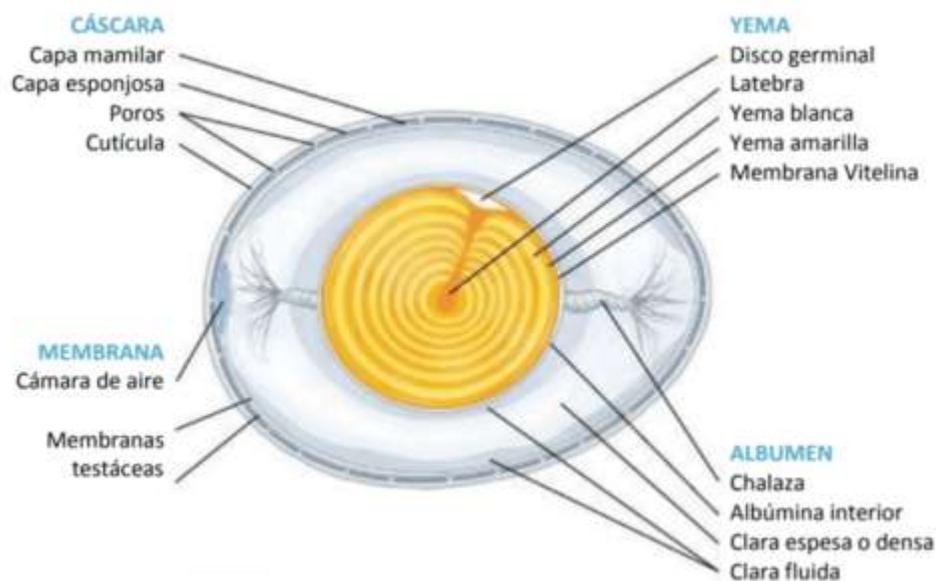
El huevo se localiza protegido de posibles contaminaciones gracias a la cáscara, membranas que actúan como barrera física y la barrera microbiológica que permite que en el interior del huevo sea estéril. Si se realiza un corte transversal, se pueden ver sus estructuras trascendentales como la cáscara, clara o albumen y yema³⁵. (Ver Figura 4). Por otro lado, las partes del huevo se dividen en partes principales que luego se subdividen en otras más específicas. (Ver Figura 5)

Figura 4. Partes principales del huevo de gallina



Fuente: García³⁵

Figura 5. Estructura y subdivisiones del huevo de gallina



Fuente: Castro³⁶

2.2.1.1 Yema

La yema se localiza en la parte central del huevo y posee un color anaranjado. Esta se encuentra rodeada de la membrana vitelina; dicha membrana le da forma a la yema y puede permitir que esta se conserve en su lugar, dando la separación de la clara. El contenido de agua que tiene la yema es cercano al 50%, y dentro de la yema se hallan las trascendentales vitaminas, lípidos y minerales del huevo, y es por esto por lo que es la parte nutricional de mayor validez³³.

En la parte interna de la yema se haya el disco germinal o blastodisco, el cual es pequeño, claro en la superficie, y es donde ocurre el inicio de la división de las células embrionarias cuando el huevo se encuentra fecundado. Los encargados de proporcionarle color amarillo a la yema son los carotenoides y alteran el tono e intensidad, dependiendo de la alimentación que recibe la gallina; además, son compuestos del efecto antioxidante.

Aquellos sólidos o materia seca se dividen entre proteínas y lípidos, existiendo una parte pequeña para las principales vitaminas, minerales y carotenoides³⁵.

Existen tres fases o etapas en la formación de la yema, las cuales son: la primera es cuando ya está formada previo al nacimiento del ave; la segunda ya empieza a formarse antes de nacer el pollo y finaliza alrededor de los 8 a 10 días antes de que este llegue a su madurez sexual; y, por último, la tercera que es una etapa apresurada que se da a los 8 a 10 días anteriores a la ovulación y la inicia la hormona estimulante de la glándula pituitaria. Cabe mencionar que el proceso de ovulación es donde ocurre el desprendimiento del ovario de la yema que ya se encuentra madura⁸.

La formación de la yema ocurre dentro del ovario; primeramente, inicia con una única célula, la cual es la célula femenina y se encuentra rodeada por la membrana vitelina; conforme se va añadiendo material nutriente, esta va creciendo, y cuando se le adiciona fluido a la yema va madurando y el origen queda en la superficie de la yema, produciendo una textura en forma de tubo que se extiende hasta el centro de la yema. La yema en desarrollo se encuentra en el saco vitelino, y aquí se encuentran muchos vasos sanguíneos, que son los encargados de llevar las sustancias formadoras a esta⁸.

2.2.1.2 Clara

Esta es un líquido transparente que se encuentra formado básicamente por agua y en menor parte de proteínas, como por ejemplo la ovoalbúmina, que es la proteína de mayor importancia; además la conalbúmina y el ovomucoide. En esta estructura se puede diferenciar según su densidad el albumen denso que es la principal fuente de riboflavina y proteína del huevo, así como también el albumen fluido que está alrededor de la yema y cerca de la cáscara³⁶.

Conforme se va recorriendo el oviducto, da como resultado que las fibras de mucina se enlacen con otras, formando cordones y de estos crean la capa chalacífera y las chalazas. Cuando ocurre el proceso de enrollamiento y se acumulan los cordones de mucina, suelen exprimir la clara fluida y que luego pasaría a la formación de la clara fluida interior. En el

gel homogéneo se organizan tres tipos de capas de albumen, las cuales son: la capa chalacífera unida a las chalazas; clara fluido interior; y clara densa. La cuarta capa corresponde a la clara fluida exterior, esta se fija al huevo mientras este se localiza en el útero, penetrando en él a través de las membranas de la cáscara. El contenido de agua y materias sólidas de la clara se distribuye por igual entre sus diversas capas⁸.

En la clara se pueden diferenciar dos fragmentos según su densidad, los cuales son: el albumen denso, que es el que envuelve a la yema, además es la principal fuente de riboflavina y de proteína del huevo; y el albumen fluido, este último es el que está más cerca de la cáscara. A la clara también se le conoce con el nombre de albumen, y se compone principalmente por agua (88%) y proteína (alrededor del 12%). La ovoalbúmina es la proteína más significativa presente, no solamente hablando cuantitativamente (54% del total proteico)³³.

La ovoalbúmina, esta proteína que se encuentra en alto porcentaje en peso del albumen, es una fosfoglicoproteína que pertenece a la familia de las serpinas y con un peso molecular de 45 KDa, conformada por una secuencia de 385 aminoácidos; además, posee propiedades bastante relevantes, ya que es utilizada en la parte culinaria y también nutritiva. En la clara de huevo también se encuentra la lisozima; esta permite que se imposibilite o se retrase el paso al interior del huevo de ciertos microorganismos. A diferencia de la yema, no posee o carece de lípidos, y vitaminas como la B2 y niacina se encuentran en mayor cantidad, en comparación con la yema³⁵.

Adicionalmente, la ovoalbúmina, cuando se encuentra en un estado de solución acuosa, podría adulterarse y agregarse a causa de tratamientos térmicos o por exposición a interfases aire-agua. Sin embargo, debido a su gran disponibilidad, ha hecho que su uso sea amplio, como por ejemplo en la elaboración estándar en varios y en diferentes estudios en cuanto a la estructura y propiedades de las proteínas, de igual forma en modelos experimentales en temas de alergias; por lo tanto, tienen un papel destacado en cuanto a las alergias que han sido causadas por el huevo³⁵.

2.2.1.3 Cáscara

La cáscara del huevo es una importante barrera contra la penetración de microorganismos hacia el interior de este, es una estructura rígida que está compuesta más que todo por carbonato de calcio y posee entre 7000 y 17000 poros, donde la cutícula de glicoproteína recubre a la cáscara y contribuye al sellado de los poros, pero la misma a través del tiempo puede deteriorarse y a la vez aumenta la permeabilidad, lo que hace que se facilite el paso de sustancias gaseosas, el agua y los microorganismos, que posteriormente penetrarían el interior del huevo³⁷.

La cáscara cubre el interior del huevo, se le atribuyen varias funciones debido a que conserva la integridad física y además sirve como una barrera para las bacterias. En cuanto al grosor, posee uno de alrededor de 0.35 mm lo que hace que certifique que no se vaya a romper fácilmente cuando se manipula. Parte de su composición mayoritariamente es de una matriz cálcica con un tramado orgánico, donde el calcio es lo que más abunda y tiene mayor relevancia, además se constituye de otros minerales como sodio, magnesio, zinc, manganeso, aluminio, cobre y boro³⁵.

Otra definición sobre la cáscara es que recubre la parte externa del huevo y posee una gran relevancia. Está compuesta en gran parte por una matriz de calcio estructural orgánica, en la que el calcio es el elemento más abundante e importante. Esta parte del huevo se encuentra atravesada por muchos poros que hacen túneles entre los cristales minerales y permiten que los gases entren dentro y fuera, dando lugar al intercambio gaseoso, y su número de poros varía entre 7,000 y 15,000⁸.

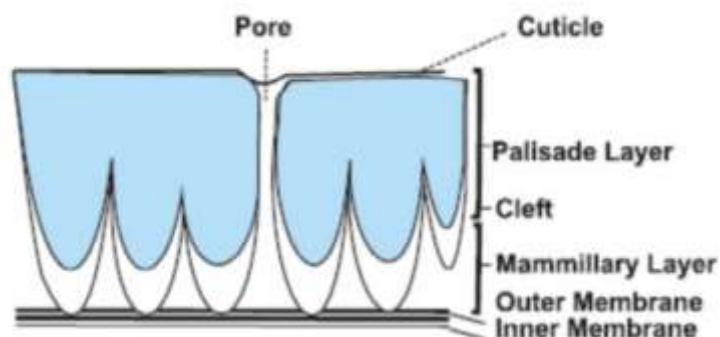
Dicho componente del huevo, en tema de formación lo hace en el útero y consta de tres capas: la mamaria o capa interna, formada por cristales de calcita que envuelven la superficie de la membrana externa de la cáscara, formando protuberancias, que se colocan perpendiculares a la superficie de esta. Una capa esponjosa que consta de pequeños cristales de calcita no dispuestos en orden, excepto en la parte exterior de la capa, donde los cristales se colocan en un ángulo recto con referencia a la superficie. Por último, la cutícula, a veces denominada erradamente como la "pelusa". Su composición química es parecida a la de la membrana. Alrededor del 94% de la cáscara seca es carbonato de calcio⁸.

En los poros y la superficie de la cáscara del huevo, está la cutícula orgánica que recubre estas partes, posee un grosor de alrededor de 10 a 20 μm (ver Figura 6) y aquí se encuentra la mayor parte de los pigmentos que tiene la cáscara, constituida importantemente por un 90% de proteínas y otras pequeñas fracciones por lípidos y carbohidratos. Dentro de la función de mayor relevancia es que esta película cierra los poros y así formar una barrera física para la prevención de que algunos microorganismos puedan ingresar, además de evitar la pérdida de agua³⁵.

La cáscara de huevo de gallina está constituida por cinco capas que son diferentes en cuanto a la forma o configuración de estas, se constituyen de manera secuencial durante el paso del huevo mediante el oviducto. Estas capas son nombradas en sentido del exterior hacia el interior como: cutícula, capa en empalizada, capa mamilar, membrana externa y membrana interna. (Ver Figura 6).

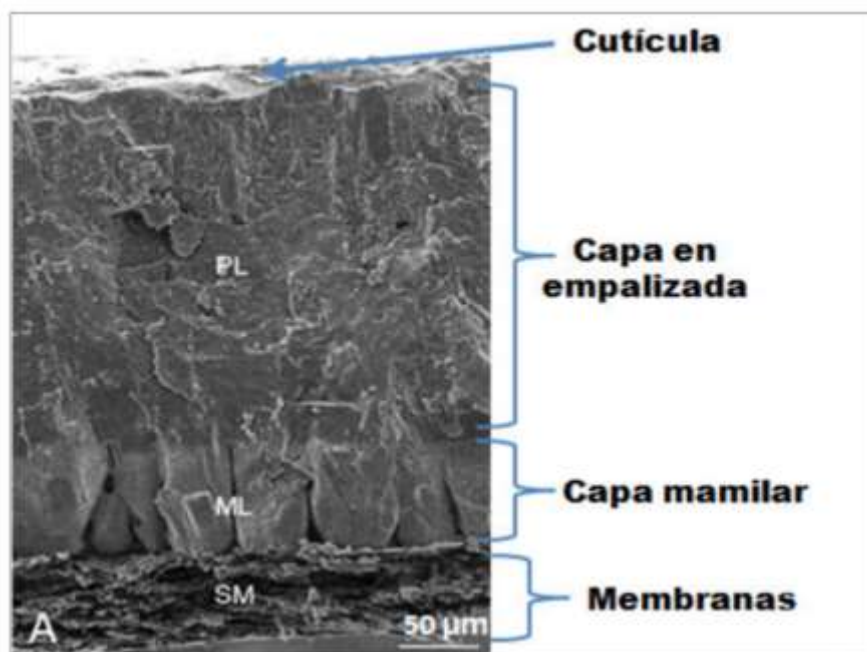
En la imagen siguiente se muestran, desde el microscopio electrónico de barridos

Figura 6. Cáscara del huevo, cutícula y membrana de estas distribuciones de la conformación de las capas¹⁶. (Ver Figura 7)



Fuente: García³⁵

Figura 7. Imagen de microscopio electrónico de barrido (SEM), de la estructura de cáscara de huevo de gallina



Fuente: Urbano¹⁶

2.3 Composición de la cáscara

Si se habla químicamente, según Urbano¹⁶ (2015), menciona que:

(...) la cáscara de huevo de gallina está compuesta de 1.60% de agua, 3,30% de materia orgánica y 95,10% de minerales, de los cuales: 93,60% corresponden a carbonato de calcio (CaCO_3) en su forma morfológica como calcita, 0,80% de carbonato de magnesio (MgCO_3) y 0.73% de fosfato tricálcico ($\text{Ca}(\text{PO}_4)_2$)¹⁶.

Esto indica la importancia de la cáscara y lo que se puede extraer de la misma, según el porcentaje posible que se pueda obtener. En otras investigaciones se ha reportado que el 39% de la constitución de la cáscara de huevo pertenece a la unidad de calcio elemental. Sin embargo, si bien el calcio se considera como el mineral que se encuentra en

mayor cantidad, autores hallaron otras cantidades útiles de otros microelementos, como por ejemplo el fósforo y el magnesio⁸.

Desde otra perspectiva, otro autor alude porcentajes similares a los ya mencionados con respecto a la composición de la cáscara de huevo siendo así un 94% correspondiente al carbonato de calcio, 1% carbonato de magnesio, 1% fosfato cálcico y 4% nitrógeno de materia orgánica especial, principalmente proteínas. El pigmento, si está presente, está en la capa esponjosa de la cáscara y es proveniente de la sangre⁸. (Ver Tablas 1 y 2.)

2.3.1 Membranas testáceas de la cáscara

Las membranas, subdivididas en externas e internas, que se encuentran en la cáscara de huevo de gallina, son bien conocidas por varios nombres que se le han atribuido, como: membranas intersticiales, membranas testáceas o fáfara. (Ver Figura 8) Estas membranas rodean el albumen y brindan un tipo de protección en cuanto a bacterias, y en suma son una posible materia prima o un insumo importante en la experimentación de muchas investigaciones, debido a los componentes que se encuentran dentro de ella¹⁶.

Figura 8. Cáscara de huevo y membranas externa pegada a esta

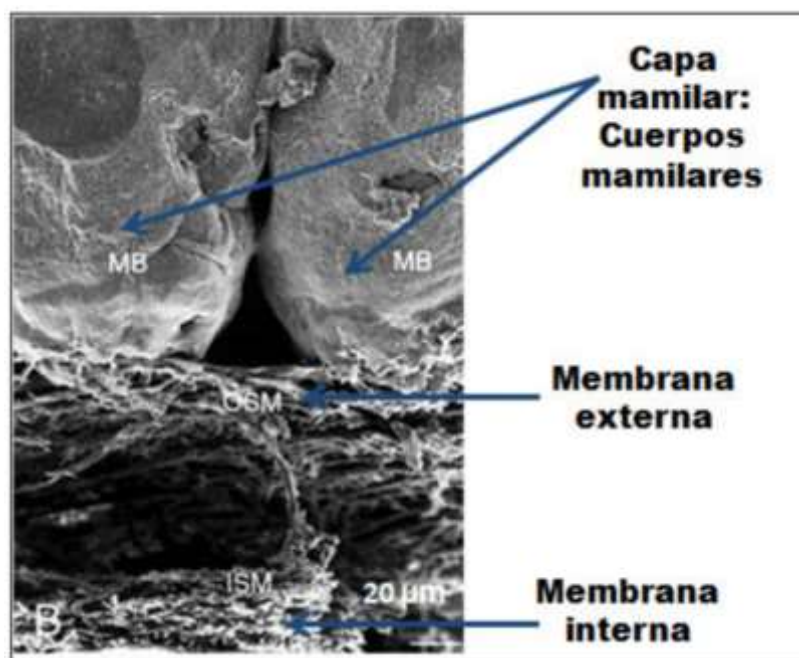


Fuente: García ³⁵

Los elementos que componen las cinco capas de la cáscara de huevo se sedimentan continuamente, de modo que forman una línea de ensamblaje, conforme el huevo de gallina progresa longitudinalmente del oviducto. La estructura de las membranas, tanto externa como interna de la cáscara de huevo se puede realizar mediante una imagen de microscopio electrónico de barrido¹⁶. (Ver Figura 9)

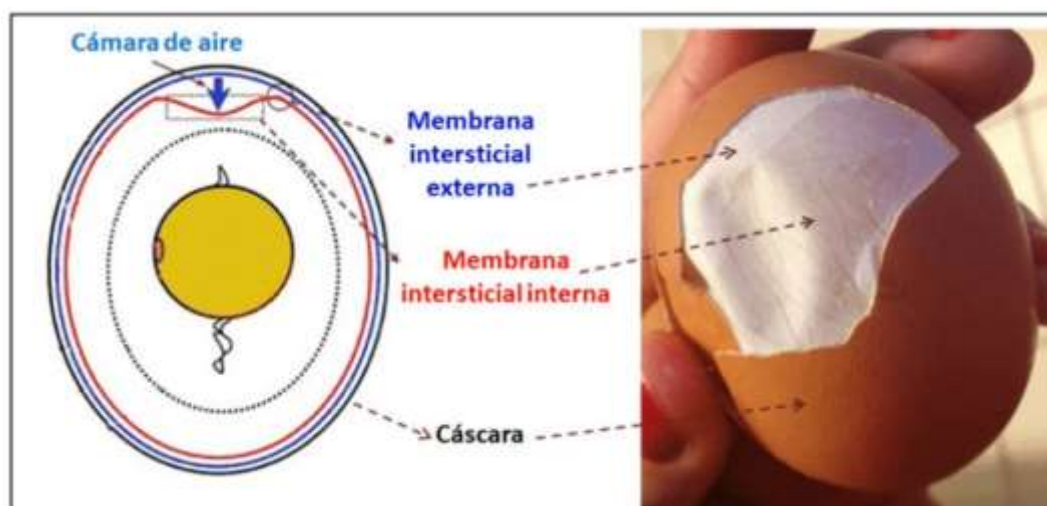
En conjunto, las membranas poseen un espesor de 65 a 96 μm aproximadamente, la capa interna que se encuentra en contacto con la albúmina tiene un grosor de 15 a 26 μm , mientras que la externa es de 50 a 70 μm de espesor; esta última se encuentra localizada entre la zona mineralizada de la membrana interna y la cáscara de huevo. Siempre estas capas están en contacto menos en la cámara de aire (ver Figura 11), y a este contacto entre los dos tipos de membranas se le conoce como un enlace irregular y tenue¹⁶.

Figura 9. Imagen de microscopio electrónico de barrido (SEM), de las membranas de la cáscara de huevo de gallina



Fuente: Urbano¹⁶

Figura 10. Representación y fotografía de las localizaciones y estructuras de las membranas testáceas del huevo de gallina



Fuente: Urbano¹⁶

Desde otro punto de vista, las cáscaras poseen unas membranas que se establecen en el huevo de gallina en el momento cuando este se localiza en el istmo. Por definición, se dice que las membranas son un compuesto nitrogenado, que se establece en una especie de red muy apretada, y que está compuesta por una sustancia muy similar a la que se puede hallar y estar presente también en las uñas de la gallina⁸.

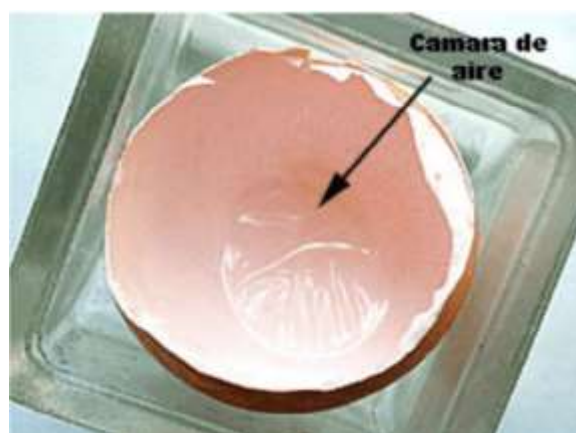
En el huevo, la formación de las membranas de la cáscara ocurre cuando el huevo se halla en el istmo. Las membranas están compuestas por constituyentes nitrogenados, en forma de red muy apretada, integrado por una sustancia parecida a la que se encuentra presente en las uñas de la gallina³³. Asimismo, la membrana interna posee una estructura de fibras de queratina que están entrelazadas; esto hace que impida la penetración de algunos microorganismos y retrasa la entrada de otros; a diferencia de la interna, la externa es más porosa y funciona para asentar en la formación de la cáscara³⁵.

En la membrana externa existe la presencia de intersticios más grandes de 5 μm en comparación con las dimensiones de las bacterias; está compuesta por fibras de alto grosor y el espesor promedio es de 1 a 3 μm . Por otro lado, la membrana interna, a diferencia de la

externa, es aún más porosa y con fibras delgadas. El máximo diámetro de las fibras interiores es de $1.5 \mu\text{m}$ y con un promedio de $0.9 \mu\text{m}$ ¹⁶.

Si se habla del orden de mayor a menor en que las estructuras del huevo de gallina pueden proteger y evitar que se contamine microbiológicamente el interior de este, la membrana interior es la mejor barrera para cumplir esta tarea gracias a la estructura de malla; luego, en segundo lugar, se le asigna a la cáscara, y por último la que posee menor efectividad es la membrana externa. No obstante, se habla que las membranas impiden

Figura 11. Cámara de aire entre cáscara y membranas del huevo temporalmente el movimiento interior de las bacterias¹⁶.



Fuente: García³⁵

La frescura de un huevo en cuanto a calidad sin depender de los días que hayan pasado luego de la puesta, se puede determinar por la altura de la cámara de aire, esto porque conforme el huevo paulatinamente va perdiendo frescura, se pierde agua con procesos de vapor mediante los poros que posee la cáscara, y la cámara de aire se va propagando o expandiendo. Para los huevos que son categorizados como “A”, su altura en la cámara de aire debe ser menor a los 6 mm ³⁵.

Las membranas que poseen la cáscara de huevo de gallina tienen una complicada red reticular de fibras estables que forman un área de superficie bastante grande (esto hace a su estructura insoluble), que simultáneamente contiene una extraordinaria permeabilidad en cuanto a los gases y al agua, asimismo a pequeñas moléculas. La red mencionada se

encuentra formada importantemente con un 88-96% del total de su peso seco, por colágeno de tipo I, V y X; de igual forma se le atribuye la presencia de otras proteínas como por ejemplo la osteopontina, sialoproteína y queratina³⁵.

2.3.2 Composición química del huevo y sus partes

Tabla 1. Composición del huevo por partes

	% Agua	% Proteínas	% Grasas	% Cenizas
Clara	88.0	11.0	0.2	0.8
Yema	48.0	17.5	32.5	2.0
Huevo entero	65.5	11.8	11.0	11.7

Fuente: elaboración propia con base en la referencia⁸.

Tabla 2. Porcentajes respectivos de la cáscara del huevo

	Cáscara
% Carbonato de Calcio	94.0
% Carbonato de Magnesio	1.0
% Fosfato de Calcio	1.0
% Materia Orgánica	4.0

Fuente: elaboración propia con base en la referencia⁸.

Tabla 3. Compuestos proteicos típicos de las membranas testáceas de cáscara de huevo de gallina

Compuesto	Porcentaje (%)
Colágeno	35
Glucosamina	10
Condroitina	9
Ácido Hialurónico	5-10
Otros constituyentes proteicos	36-41

Fuente: elaboración propia con base en la referencia¹⁶.

Figura 12. Composición de la yema y clara

Proteínas	16,1 g	11,1 g
Carbohidratos	0,3 g	0,7 g
Lípidos	31,9 g	0,2 g
AG saturados	9,3 g	0 g
AG monoinsaturados	12 g	0 g
AG poliinsaturados	5,3 g	0 g
Colesterol	1260 mg	0 mg
Vitaminas		
B1	0,29 mg	0,022 mg
B2	0,4 mg	0,32 mg
B3	4,2 mg	3,4 mg
B6	0,3 mg	0,012 mg
B9	159 µg	9,2 µg
B12	2 µg	0,1 µg
C	0 mg	0 mg
B5	3,7 mg	0,14 mg
A	886 µg	0 µg
D	5,6 µg	0 µg
E	5,5 mg	0 mg
K	2 µg	0,01 µg
B7, B8 o H	53 µg	7 µg
Minerales		
Calcio	140 mg	11 mg
Fósforo	590 mg	21 mg
Hierro	7,2 mg	0,2 mg
Iodo	12 µg	6,8 µg
Cinc	3,8 mg	0,02 mg
Magnesio	16 mg	12 mg
Sodio	51 mg	170 mg
Potasio	138 mg	154 mg
Selenio	19 µg	5,4 µg
Otros compuestos		
Colina	682,3 mg	1,1 mg
Luteína y zeaxantina	1094 µg	0 µg

Fuente: Valverde³¹

2.4 Usos del huevo

Tanto la cáscara del huevo como su respectiva membrana en la actualidad son materiales de desecho, que son de bajo costo y abundantes, ya que se les dan muchos usos comúnmente como alimento para animales, como cal sustituida o como fertilizante. Sin embargo, existen muchos otros usos, ya sea de la fracción cáscara sin membrana y las que poseen membranas intersticiales dentro de muchos campos¹⁶.

Los huevos son un alimento muy sustancial, debido a su valor nutricional y a su precio bajo. Según cifras del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación el gasto de huevo en España es de 168 kg per cápita; esto significa que es alrededor de unos 265 huevos por persona al año; la mitad de todos los huevos frescos se consumen en el hogar (8 kg per cápita). En otras palabras, se consume en partes equivalentes dentro y fuera de las viviendas, en sí o como sus procedentes³³.

El huevo que es más consumido alrededor del mundo es el huevo de gallina; se habla de un aproximado de 92% en total. Asimismo, se pueden hallar factiblemente otros tipos de huevos, como por ejemplo los de codorniz, que se comercializan tanto crudos como enlatados, cocidos y envasados; el consumo de este tipo de huevo es bajo. Los ovoproductos son derivados del huevo, que han sido procesados y se fabrican controlando al huevo en un tratamiento de higienización y conservación, con el fin de eliminar cualquier peligro sanitario, alargar su vida útil y/o facilitar el manejo del huevo en industrias alimentarias, restauración y usos profesionales³³.

Los ovoproductos pueden ser hechos a base de huevo entero (clara y yema) o solamente de una parte del huevo (clara o yema) y se pueden mostrar de manera líquida o en polvo; por lo general, más que todo se utilizan las claras del huevo. Se emplean en varios ámbitos, tales como en la industria alimentaria (repostería, salsas o platillos) y en áreas de alimentación o uso colectivo (restaurantes, escuelas, colegios, universidades, hospitales e instituciones) en sustitución del huevo natural con cáscara³³.

Es interesante que en países como España es ilícito la utilización del huevo fresco en la restauración colectiva para cualquier plato cocinado a una temperatura inferior a 75 °C. En las hábitos o recetas gastronómicas, el huevo está típicamente presente en diferentes

maneras culinarias, se manipula tanto cocinado como crudo (mayonesas, merengues) o semicrudo, y se consume en sí tal cual o como un elemento más en la preparación de variados platos, tanto dulces como salados³³.

La cáscara de huevo de gallina se ha ingerido como un suplemento de calcio, demostrando beneficios para la salud, con resultados importantes en casos de reducción de la pérdida ósea. Se realizaron estudios clínicos en mujeres, quienes estaban en un periodo posmenopáusico y en personas con patologías de osteoporosis u osteopenia, manifestaron que el consumo de calcio en polvo, que fue tomado de la cáscara de huevo, se relaciona con un incremento de la densidad mineral ósea de la cadera y de la columna lumbar¹⁶.

Existen diversas utilidades de las fracciones de cáscara de huevo sin membranas en el área de salud y otros campos, y otras aplicaciones que se podrán poner en práctica en el futuro. Por ejemplo, en la biorremediación se puede usar en la remoción de metales pesados del agua, de suelos utilizando la cáscara de huevo en polvo, en la industria cosmética la cáscara sin membrana en forma de micropartículas se utiliza como agente limpiador facial. Mientras que en el campo nutricional se aplica en vinagre enriquecido con calcio, suplemento de calcio, síntesis de carbonato de calcio, glutamato de calcio, fosfatos monocálcico y dicálcico y de calcio orgánico¹⁶.

El uso en diferentes industrias de la cáscara de huevo sin membrana puede ser como fertilizante, relleno para materiales compuestos, tiza de pizarra sin agrietar la piel, para impresión por inyección de tinta debido a su estructura de macroporos, en la producción de hidrógeno puro como futura aplicación. En el campo médico, se utiliza en la extracción de polipéptidos para el crecimiento de osteoblastos, en síntesis, de polvo cerámico con contenido de nanopartículas de hidroxiapatita como aplicación a futuro, y también en implantes y prótesis como sustituto óseo¹⁶.

Por otra parte, las membranas intersticiales de cáscara de huevo también tienen muchas y diversas aplicaciones; en el campo médico se pueden utilizar en la extracción de ácido hialurónico mediante el aislamiento, y posteriormente en el tratamiento de osteoartritis y enfermedades periodontales, en la extracción de componentes bioactivos, en el tratamiento

de hipertensión mediante su hidrólisis enzimática de algunos compuestos, en el tratamiento de trastornos gastrointestinales, en bio-plataforma de inmovilización¹⁶.

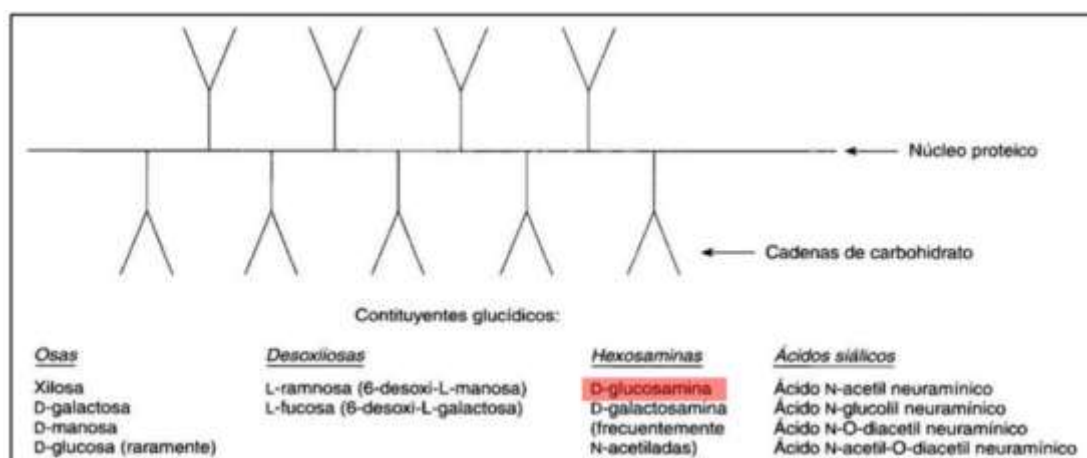
También las membranas testáceas se pueden emplear en la ingeniería de tejidos, por ejemplo, en el yeso adhesivo para tratar heridas, recubrimientos para heridas. En la nanotecnología y biorremediación en soportes de poros nanométricos, como separador de iones metálicos; en el campo cosmético el hidrolizado en la creación o producción de crema, maquillaje en polvo y en cosméticos para prevenir las arrugas debido a su gran contenido de colágeno, y otros beneficios adicionales en mejorar la elasticidad y grosor de la piel¹⁶.

2.5 Extracción de proteínas de las cáscaras de huevo

La túnica que envuelve cada fibra le proporciona la capacidad de consistencia de gel sólido para la resistencia a las fuerzas de compresión mediante las propiedades viscoelásticas de las membranas intersticiales. En estas membranas existen cantidades importantes de glucosamina; esta es una fracción glucídica de las glicoproteínas que se

Figura 13. Esquema de organización de la estructura general de las glicoproteínas

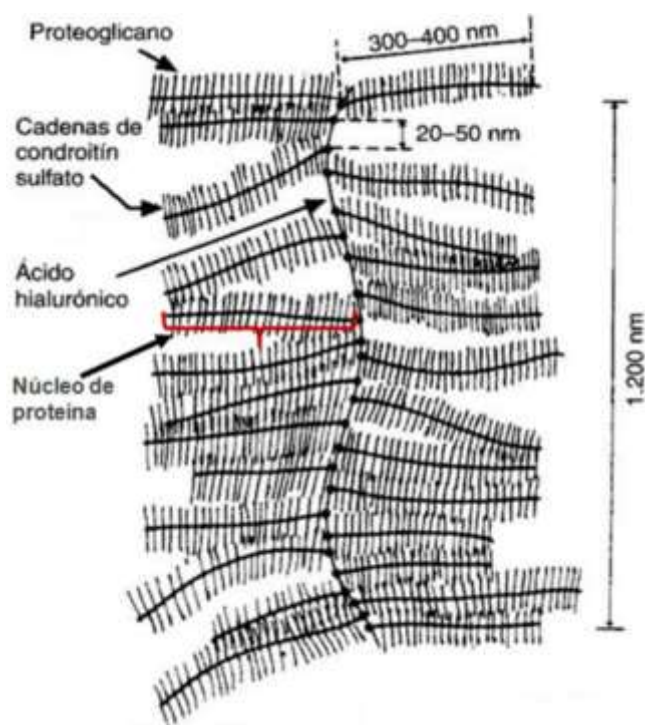
encuentran en el manto¹⁶. (Ver figura 13).



Fuente: Urbano¹⁶

Estos proteoglicanos que están en el manto de las fibras de las membranas intersticiales o fáfarras son unidades formadas de 95% de glucosaminoglicanos, o también llamados mucopolisacáridos, y el 5% restante corresponde a las proteínas. El ácido hialurónico es el elemento central organizadora del proteoglicano; desde esa cadena central se pueden observar las largas proteínas el proteoglicano que funcionan como punto para unirse a muchas otras cadenas del polisacárido condroitina¹⁶ (Ver Figura 14).

Figura 14. Configuración de los componentes de los proteoglicanos



Fuente: Urbano¹⁶

Para lograr la desintegrar o separar las membranas testáceas de la cáscara de huevo de gallina a partir de los residuos de estas, para posteriormente extraer las proteínas presentes en este tipo de membranas, se pueden utilizar para esto diversos procesos de separación como, por ejemplo, químicamente la disolución de la fase mineralizada, físicamente por

diferencia de densidades y por tratamiento con microondas, que serán detalladas más adelante¹⁶.

2.5.1 Separación química de la cáscara y membranas por disolución de la fase mineralizada

En la división de las cáscaras y las membranas fárfaras, mediante los despojos de las cáscaras de huevo de gallina, esto se puede obtener al poner en disolución dichas cáscaras con ácidos. Existe un estudio en el año 2000, donde utilizaron ácido clorhídrico (HCl) a diferentes niveles de concentración entre 0.15 N – 1,68 N a una temperatura de 20° C y en un tiempo máximo de 90 minutos; dentro de los resultados se dice que la sustancia de HCl de mayor concentración no es de la que se obtiene un mayor porcentaje de disolución de la cáscara, aunque se deje en mayor tiempo en ella¹⁶. (Ver Figura 15)

Según Urbano, la reacción que se da en el proceso que se llevó a cabo en la siguiente ecuación¹⁶:

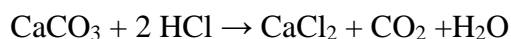
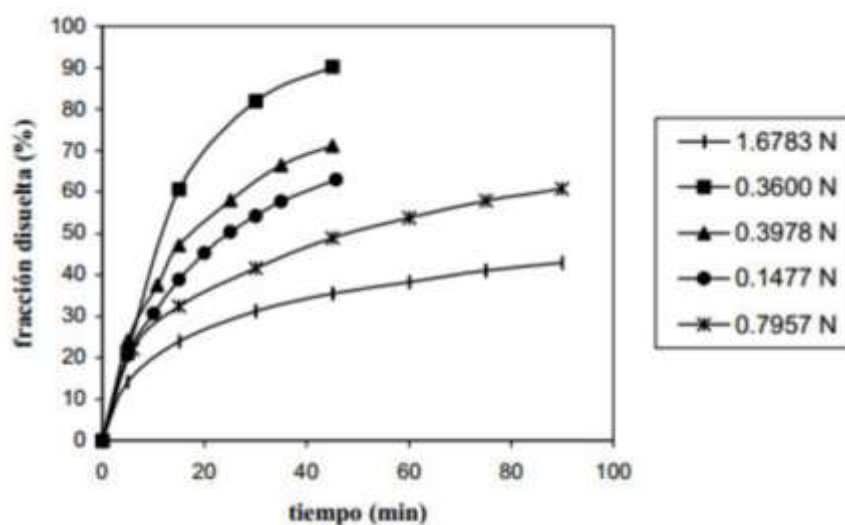


Figura 15. Disolución de la cáscara de huevo de gallina en HCl de diferentes concentraciones a 20 °C y a distintos tiempos



Fuente: Urbano ¹⁶

La cáscara de huevo, que fue disuelta en las diferentes concentraciones de ácido clorhídrico, estuvo controlada con una titulación de calcio con disoluciones valoradas de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). En el tratamiento de la concentración de HCl 0.36 N y con un tiempo de 45 minutos, fue donde se obtuvo un mayor porcentaje de calcio disuelto; es extraño este comportamiento, ya que se esperaría conseguir un mayor número de calcio disuelto en la disolución de mayor concentración y en menor tiempo. Además, en otro resultado, aun cuando el método es efectivo, también existieron precipitados de sales y en la afectación de las proteínas que se encuentran en las membranas testáceas¹⁶.

2.5.2 Separación física de la cáscara y membranas por diferencia de densidades

Primeramente, en este tipo de separación se debe disminuir el tamaño de partícula de las cáscaras de huevo de gallina. Una vez que ya estén estos residuos triturados, a lo largo de este tratamiento las partículas son desgastadas parcialmente, logrando así que la parte que une entre las membranas y las cáscaras se rasga, pero no del todo. Después de esto, se colocan en un tanque con agua con fuerzas turbulentas y las membranas se separan totalmente, quedando atrapadas en el fragmento superior y posteriormente son tamizadas¹⁶. (Ver figura 17).

El creador de este método fue MacNeil en el 2001; él diseñó y desarrolló un equipo que, de forma más innovadora, simple y a un costo bajo, pudo separar la fracción de membranas testáceas de las cáscaras o el mineral duro, procedentes de los restos de cáscara de huevo de gallina. Asimismo, logró de esta manera que se posibilitara la utilización de cada una de las corrientes en diversos usos, brindando un aprovechamiento a nivel económico de los productos¹⁶.

Esta técnica se representa en el diagrama de flujo de la Figura 17, y en la Figura 18 se muestra el equipo desarrollado por MacNeil; este es un conjunto de sistemas, donde cada uno se compone de diversas partes que cumplen con determinadas funciones, y este equipo se describe a continuación:

(...) un sistema de procesamiento continuo que consta esencialmente de tres sistemas: el primero, un sistema de separación por diferencia de densidades, el segundo, un

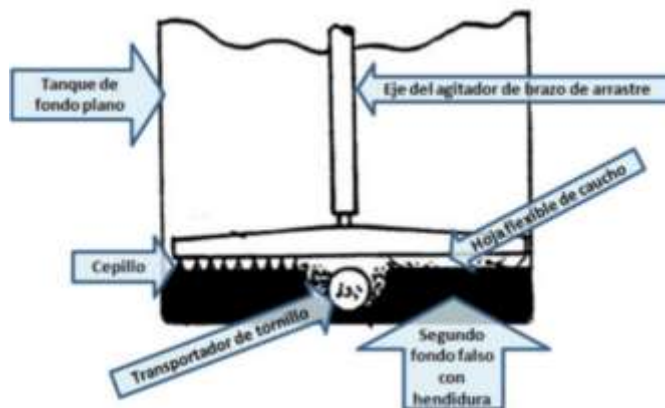
sistema de recuperación de las partículas de membranas intersticiales y el tercero, un sistema de recuperación de partículas de cáscara aislada¹⁶.

En cuanto a los elementos que componen al sistema de separación por diferencia de densidades, primeramente, las cáscaras de huevo de gallina se recogen en una tolva de alimentación para reducir el tamaño de partícula a unos 0.5-4 mm para que se consiga la menor cantidad de polvo de cáscara. Este aparato de disminución constituye un motor y una cabeza de corte, que le brindan la acción de corte con un efecto abrasivo y permite la separación; las partículas se depositan en la parte media de un tanque lleno de agua y la separación total se da por diferencia de densidades, debido a la turbulencia que genera el agitador de brazo de arrastre y sedimentan la cáscara¹⁶.

Lo que corresponde a los componentes del sistema de recuperación de las partículas de membranas testáceas, los conductos son de 5 a 6.4 cm, donde se encuentran distantes del de alimentación de los residuos de cáscaras de huevo de gallina. Cumple una labor de transportar membranas, luego con una bomba de succión de agua, donde una banda transportadora con tamiz retiene a las mismas, pero no al agua, y posteriormente son recolectadas para los siguientes procesos¹⁶.

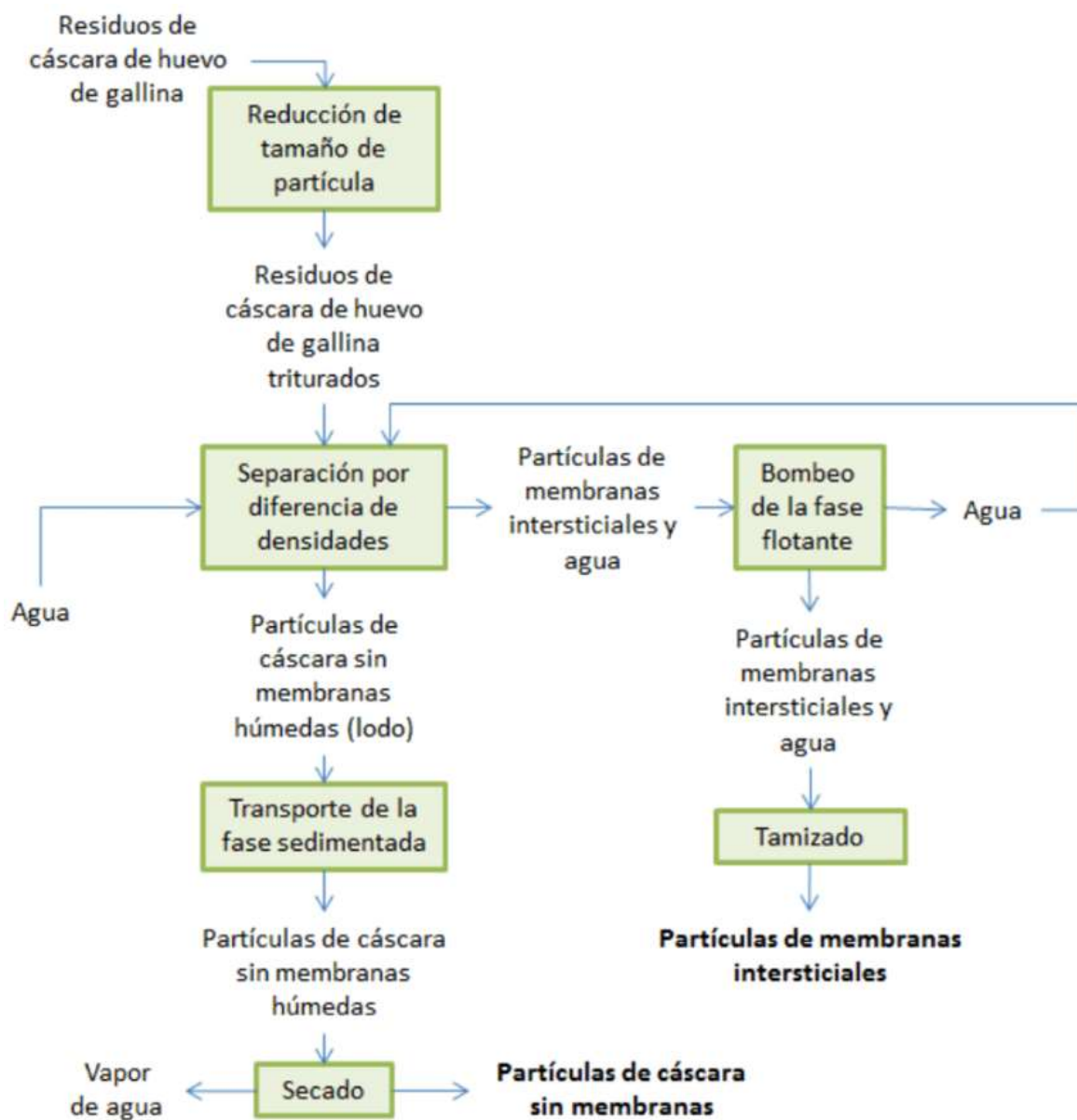
Por último, los constituyentes del sistema de recuperación de partículas de cáscara aislada, se conforman por fondo falso con hendidura y reciben a las partículas de cáscaras que suelen precipitar, las que caen en el doble fondo mediante la ranura y el brazo de barrido del agitador, este posee dos lados: escobilla y cepillo (Ver Figura 16). Este sistema puede conseguir una temperatura de hasta 100 °C¹⁶.

Figura 16. Descripción de los componentes del agitador de brazo de arrastre



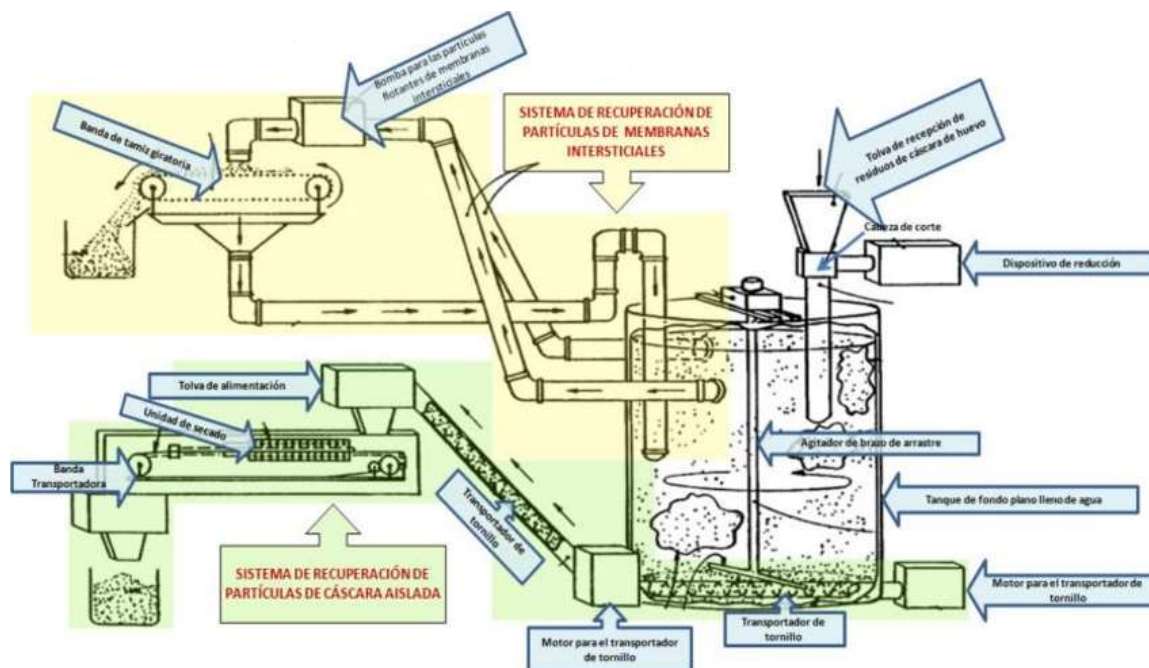
Fuente: Urbano ¹⁶

Figura 17. Representación del funcionamiento del equipo para la separación física de las membranas intersticiales y cáscara a partir de residuos de cáscara de huevo de gallina



Fuente: Urbano¹⁶

Figura 18. Representación del equipo para la separación física de las membranas y cáscaras a partir de residuos de cáscara de huevo de gallina



Fuente: Urbano¹⁶

2.6 Extracción de compuestos de membrana de huevo

El proceso de separación y purificación de proteínas es una importante consideración previa ante una condición precisa para la utilización de estas en la parte de biomedicina e industrias, ya sean en la farmacéutica o en la alimentaria. Ya existen diferentes métodos de separación como precipitación, centrifugación, ultrafiltración, adsorción y electroforesis; la adsorción se ha utilizado de forma extensa por su economía, rapidez y la sencillez con respecto a su trabajo. En la actualidad, vacunas y medicamentos procedentes de proteínas naturales o recombinantes se utilizan para tratar patologías tales como diabetes, cáncer y hemofilia; para esto es necesario emplear los métodos desarrollados para obtener proteínas purificadas³⁸.

La alta demanda de utilizar péptidos y proteínas en muchas áreas de la ciencia ha hecho que se renueven las técnicas de purificación de estas, lo que también ha convertido que

todos estos métodos sean un campo de estudio bastante extenso. El obtener una proteína con característica de pureza accede, de forma directa y específica, que se pueda determinar su función, estructura, estabilidad, la posibilidad de interacción con distintas biomoléculas, con el fin de intuir los métodos moleculares y celulares. También, se investiga la oportunidad de poder aplicar la proteína en ámbitos como; biotecnología, biomedicina, nanobiotecnología, entre otras áreas³⁹.

Cuando se realiza la medición exacta de las proteínas en términos numéricos, el estudio y evaluación de su pureza son fundamentales en muchos sectores de la ciencia y la investigación. Este es un elemento de carácter crítico en cuanto al uso en el campo clínico, debido a que existen diversas maneras y técnicas para cumplir este objetivo; de ahí nace que la elección de una prueba conveniente va a depender de constituyentes, como el nivel de sensibilidad solicitado y la existencia de elementos que obstaculizan la conformación de la proteína⁴⁰.

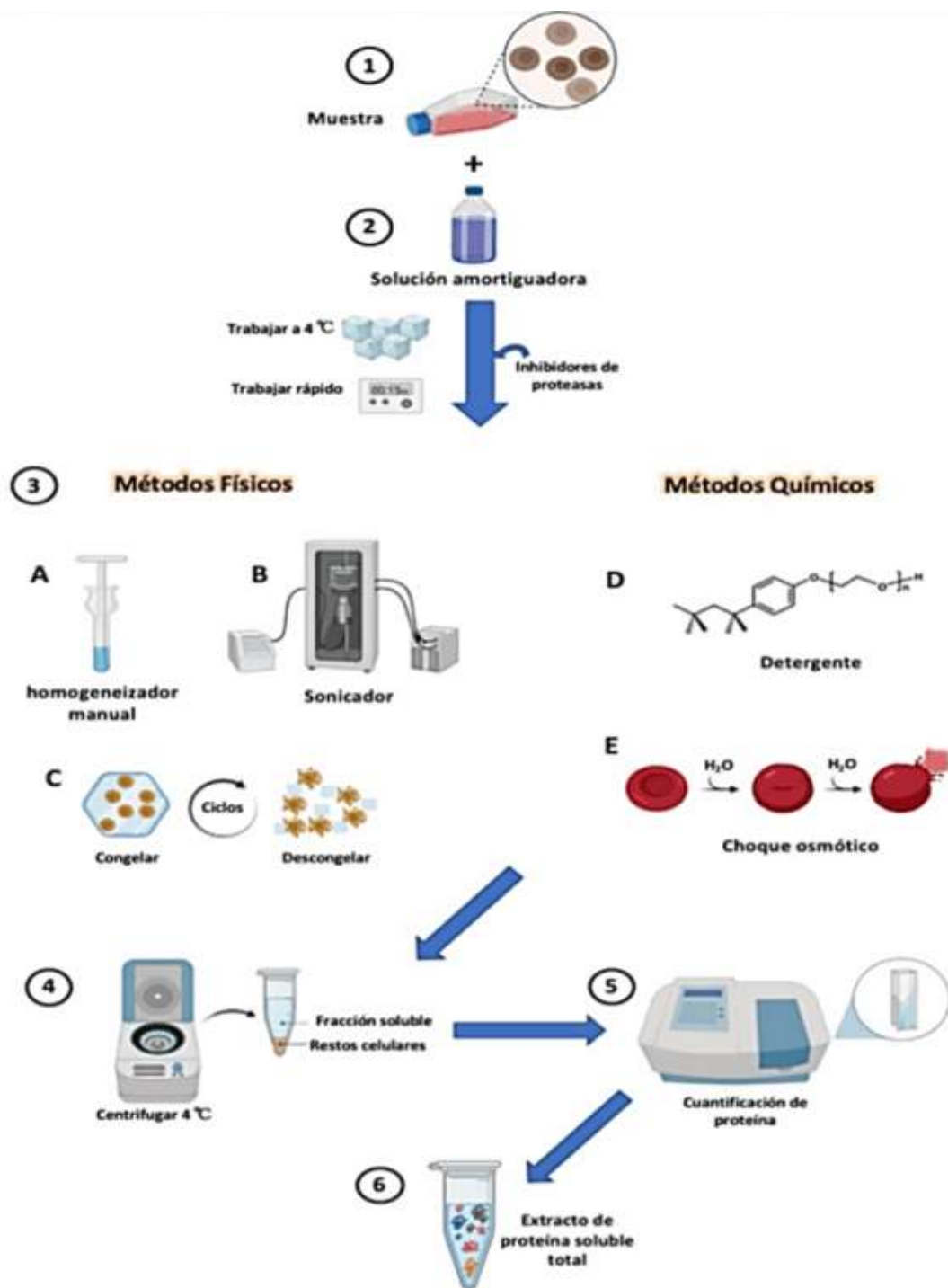
Para la purificación de proteínas se puede realizar siguiendo un procedimiento establecido, que luego de llevar a cabo este protocolo, es importante que la proteína se mantenga en las condiciones que le favorece para poder facilitar su conservación en cuanto a su función y estructura. Dicho procedimiento se detalla a continuación:

Se inicia seleccionando la muestra biológica, el método y la condición para lisar las células con la finalidad de exponer a las proteínas, inevitablemente obteniendo una mezcla de estas junto con todos los componentes de la célula, biomoléculas, metabolitos y fragmentos de estructuras celulares³⁹.

Un ejemplo de lo expuesto anteriormente se da en la adquisición de un extracto proteico (ver Figura 19). Primeramente, se elige la muestra a analizar (1); luego se selecciona la solución amortiguadora conveniente para lograr el rompimiento del tejido y se extraiga la proteína total sin afectar su estructura y función (2); seguidamente, se establece la técnica tanto como físicos o químicos para lisar la membrana celular (3). Posteriormente, se da el aclaramiento (4), que radica en aislar fragmentos celulares de las proteínas solubles a través de la centrifugación. Finalmente, se mide la cantidad de proteína mediante la ayuda de un

espectrofotómetro (5). El extracto obtenido es el modelo del que se fracciona para emplear una o algunas técnicas de purificación de proteínas (6)³⁹.

Figura 19. Obtención de un extracto proteico

Fuente: Ramírez *et al.*³⁹

2.6.1 Extracción de ácido hialurónico por el método de hidrólisis

La membrana de la cáscara de huevo de gallina se encuentra bastante constituida por metabolitos que son de gran utilidad en materia biológica; como ejemplo de ello se puede mencionar: "colágeno, elastina, glicosaminoglicanos (ácido hialurónico, sulfato de 10 condroitina, heparán sulfato, dermatán sulfato) así como glucosamina"³². En varias investigaciones se ha demostrado que en esta parte de la cáscara de huevo (la membrana) se han logrado detallar más de 500 proteínas implicadas en el transcurso de mineralización de la cáscara de huevo, así como también en el resguardo del embrión, todas estas proteínas se consideran de gran interés y se podrían utilizar como suplemento, para mejorar de la calidad de la piel y las articulaciones⁴¹.

Primeramente, debido a la naturaleza insoluble de la membrana intersticial de la cáscara de huevo de gallina, hace que en la industria se dé un problema técnico relacionado con esto, se le asigna la causa de esta insolubilidad a la naturaleza fibrosa y a la constitución estructural de la membrana testácea, ya que se puede decir que esto se debe mayormente al colágeno que se encuentra entrelazado con la elastina y queratina; asimismo, por los múltiples enlaces de disulfuro que se hallan, constituyendo parte de esta estructura⁴¹.

La reacción química donde una molécula de agua interacciona con diversos componentes de otra molécula para generar otras más simples, corresponde a la hidrólisis; esta induce a la descomposición de moléculas que son complejas, mediante el desplazamiento de la agrupación saliente del compuesto original por un grupo OH correspondiente al agua, y esto ocurre por medio de un enlace de tipo covalente¹⁶.

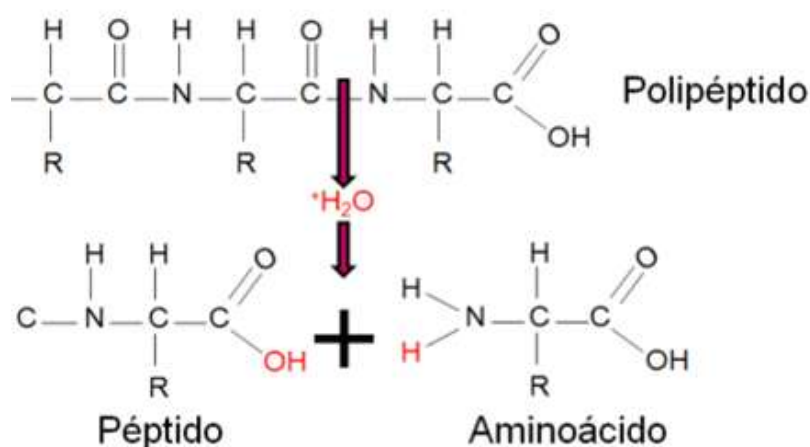
Se deben degradar las proteínas para que se pueda dar la disolución, y esto se puede alcanzar mediante procesos de hidrólisis. Para lograr solubilizar las proteínas hay tres rutas esenciales: hidrólisis ácida, básica y enzimática. La hidrólisis ácida y la alcalina que se usan ordinariamente, estos tipos logran degradar parte de la composición de la proteína y disminuyen el valor nutritivo o componentes de interés, que no permiten la caracterización de la proteína. Mientras que, por otro lado, la hidrólisis enzimática tiene la virtud por

encima de estas de emplear circunstancias leves, que permiten obtener un producto de preferibles características nutricionales y probables bioactividades⁴¹.

Cuando se utilizan proteínas, esta hidrólisis reside en romper el enlace peptídico que mantiene unidos a los aminoácidos, lo cual provoca que se generen cadenas de péptidos de distintas dimensiones, debido a que las cadenas que se rompieron pueden volver a pasar el proceso de ruptura y dividirse de nuevo; esto puede ocurrir hasta que se degrade la proteína inicial en sus aminoácidos constituyentes. La forma en que se efectúa la reacción de hidrólisis en el enlace peptídico de una proteína se puede mostrar en la Figura 20, donde se muestra que el grupo OH se une por un enlace covalente al grupo carbonílico de la cadena peptídica y el átomo de hidrógeno se une al grupo amino; esto quiere decir que conforma al aminoácido que ha sido fragmentado¹⁶.

El desarrollo de la hidrólisis en las proteínas puede ser de carácter químico o enzimático, donde, en los hidrolizados químicos, se realiza en condiciones ácidas o alcalinas drásticas. En la hidrólisis alcalina se utiliza por lo general hidróxido de sodio, una base para que catalice la reacción; de este mismo modo, entonces la velocidad en la que ocurre la reacción de hidrólisis de tipo química alcalina, será meramente dependiente de la concentración a la que esté la solución de hidróxido de sodio que se vaya a utilizar, para que se dé el proceso de hidrólisis¹⁶.

Figura 20. Representación del mecanismo de reacción de hidrólisis sobre el enlace peptídico



Fuente: Urbano¹⁶

En resumen, como se mencionó anteriormente, la hidrólisis se puede realizar generalmente por tres procesos para solubilizar las proteínas, las cuales son: ácida, básica y enzimática. La ácida, así como también la hidrólisis básica, poseen la desventaja de destrozarse ciertos componentes de utilidad y reducir el valor nutricional de ciertas proteínas. Por otro lado, la hidrólisis de tipo enzimática resulta preferible en comparación con las otras, debido a que tiene el mérito de utilizar condiciones leves que ayudan a conseguir un producto con características nutricionales favorables y posibles bioactividades⁴¹.

En el año 2012, los autores Strohbehn et al.⁴² realizaron una técnica para concentrar, de las membranas testáceas, el material proteínico procedente de desechos de la cáscara de huevo de gallina, mediante el proceso de solubilizar las proteínas con el proceso de hidrólisis alcalina, sometiendo este material en una cantidad suficiente de solución básica, se obtuvo un sobrenadante con un pH de carácter básico que estuvo en un tiempo y temperatura requerida para así que ocurriera la hidrólisis, y se tuvo también que enfriar la mezcla del sobrenadante y el material proteínico⁴².

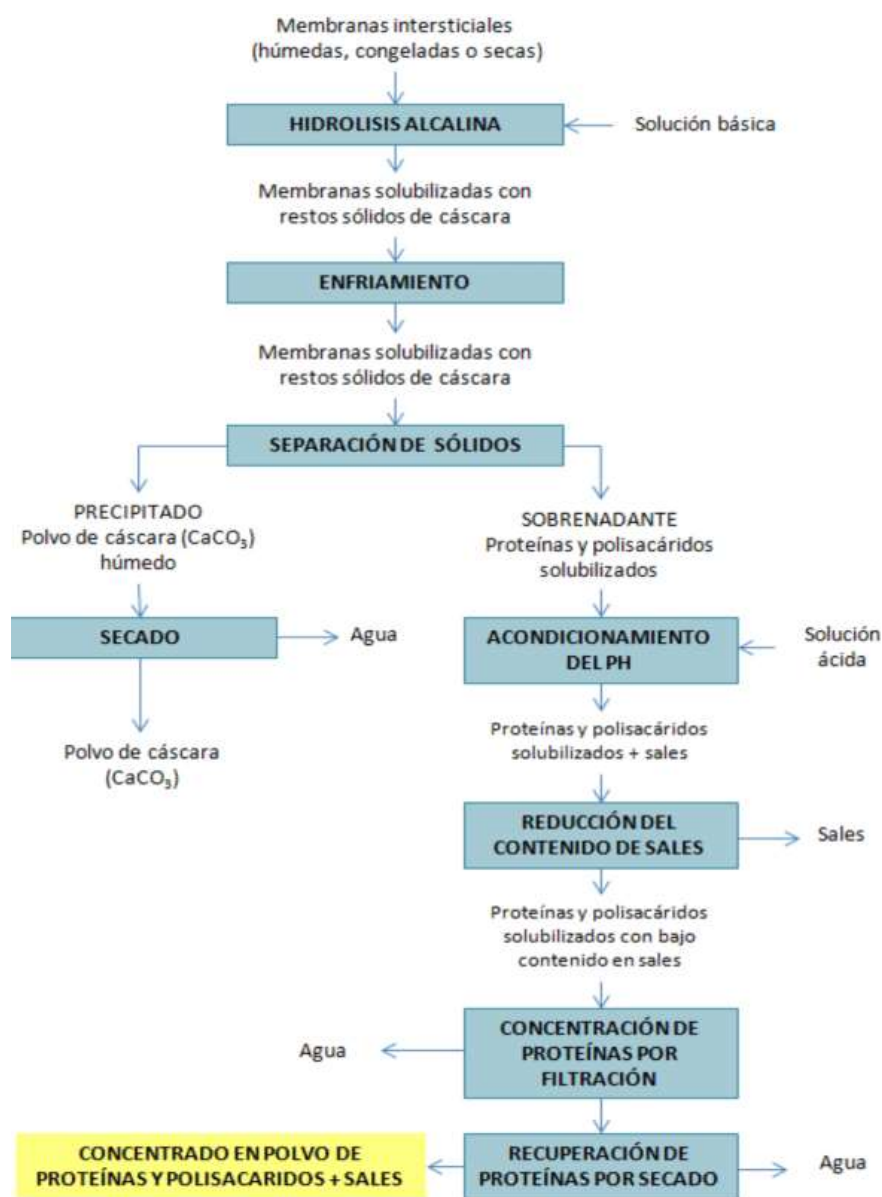
Esta técnica hizo que se pudiera conseguir un producto, donde la composición de proteína solubilizada fuese prominente sin utilizar enzimas proteolíticas, estas son enzimas que separan a las proteínas hasta llegar a sus aminoácidos mediante la hidrólisis; este tipo de enzimas “reconocen y fijan pequeñas secuencias parciales del sustrato y luego hidrolizan enlaces relativamente específicos entre ciertos residuos de aminoácidos”¹⁶.

El proceso se puede emplear en la industria, ya que posee varias ventajas como: económica, y conserva al mismo tiempo la pureza, así como también la actividad de la proteína que ha sido solubilizada; esta es la razón por la cual se considera de bajo costo. La hidrólisis alcalina, como método para solubilizar las proteínas que están presentes en las membranas intersticiales, tiene un punto a favor adicional, debido a que la constitución proteica obtenida puede utilizarse como fuente para aislar y purificar proteínas determinadas, tal como lo es el colágeno¹⁵. Este esquema, que fue propuesto por Strohbehn et al.⁴², se puede mostrar en la representación de la Figura 21.

En la hidrólisis alcalina se deben elegir condiciones adecuadas a considerar para este proceso; entre ellas se pueden mencionar: las diversas soluciones (casi siempre se utilizan

soluciones básicas como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio e hidróxido de calcio), la concentración de estas, la temperatura y el tiempo de reacción, entre otras. Todas estas especificaciones deben realizarse con el fin de cumplir con el objetivo de conseguir solubilizar las membranas con menor partes de sales, en un tiempo de reacción menor a las 12 horas¹⁶.

Figura 21. Proceso de extracción de proteínas a partir de membranas intersticiales de cáscara de huevo de gallina



Fuente: Urbano¹⁶ y Strohbahn *et al.*⁴²

2.6.1.1 Enzimas en procesos de extracción de ácido hialurónico

Cuando la membrana de cáscara de huevo se encuentra ya hidrolizada, posee varias unidades bioactivas que consiguen alterar la fisiología y la apariencia del cabello, la piel o las uñas. Como muestra de esto, al ser la membrana de la cáscara de huevo de gallina bastante sustanciosa en glicosaminoglicanos, estos son polisacáridos, moléculas complejas que poseen una carga altamente negativa que podrían intervenir en la biomineralización. Un ejemplo de glicosaminoglicanos que forman parte de moléculas más grandes es el de los proteoglicanos¹⁹.

En lo que respecta a la obtención del ácido hialurónico de las membranas testáceas que están presentes en las cáscaras de huevo, como se mencionó anteriormente, existen dos formas o maneras de hacerlo, ya sea enzimáticamente, donde se puede aislar el material biológico por medio de enzimas como la triptasa, papaína, tripsina o pepsina. Por otra parte, químicamente el ácido hialurónico se puede separar comprimiendo progresivamente la longitud de la cadena, cambiando el pH, por ultrasonido, por la acción del acetato de sodio, y el etanol con agregación de ácido clorhídrico⁷.

Otros autores mencionan que es importante que las enzimas a utilizar en este proceso sean proteasas y que posean un origen vegetal, que su actividad sea endopeptidasa, pertenecientes al grupo de cisteín proteasas. La utilización de las enzimas en la hidrólisis es con el fin de que estas puedan ingresar y separar las proteínas, pero primeramente se debe descomponer la estructura cuaternaria, terciaria y secundaria de la proteína. Si se utiliza un agente desnaturizante, puede destruir la estructura bi y tridimensional de las proteínas al agregarles carga negativa a los aminoácidos; con esto, la enzima puede acceder más fácil para su hidrólisis³⁶.

A lo que concierne a la pepsina, esta es una proteasa aspártica, y además es la vital enzima digestiva en el estómago de los animales. Esta enzima se segrega en forma de pepsinógeno en las células principales localizadas en el epitelio de la pared estomacal. Es comúnmente usada en muchos ambitos; por ejemplo, en la industria alimenticia para coagular la leche en la fabricación de quesos, en la preparación de batidos e hidrolizados proteicos, cereales precocidos, entre otros usos⁴³.

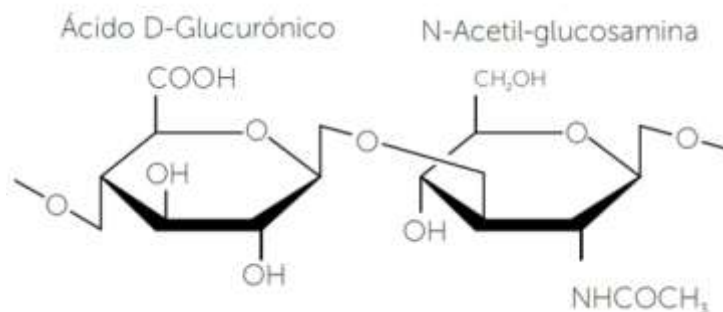
Asimismo, se utiliza para eliminar el vello y los residuos en el cuero, en hidrólisis de IgG y en terapias para la regulación de digestión, entre otros. Las pepsinas que son mercantilizadas y manejadas en la industria poseen un origen porcino, vacuno y microbiano. No obstante, las enzimas que son obtenidas de las vísceras de los peces se pueden usar para diversas aplicaciones tecnológicas. A la hora de utilizar este tipo de enzimas activas para la obtención del colágeno, por ejemplo, se debe hacer a pH no tan ácidos, como es la obtención de colágeno, se debe realizar a un pH próximo a 3, y la temperatura adecuada para la actividad de esta enzima es de 45 °C⁴³.

2.7 Ácido Hialurónico

Según Abatangelo et al.⁴⁴ (2020), mencionan que “el ácido hialurónico es un polisacárido largo no ramificado compuesto de disacáridos repetidos de D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina con peso molecular que alcanza hasta 2×10^7 Da”³⁸. (Ver Figura 22). Este fue separado por primera vez por los investigadores Karl Meyer y John Palmer en el año 1934, del cuerpo vítreo del ojo bovino; sin embargo, su estructura fue explicada en 1970 por Laurent. Gracias a los grupos carboxilo, que están presentes en la molécula del ácido hialurónico, este tiene carga negativa, es muy hidrófilo, y en altos pesos moleculares representa una red viscosa⁴⁴.

Además, si se habla del Ácido Hialurónico (AH) desde la perspectiva química, este es un polisacárido del tipo de glicosaminoglicanos, que también es llamado como mucopolisacárido, por tener una cadena larga no ramificada; es una sustancia con una textura altamente viscosa utilizada en varios aspectos médicos y estéticos⁴⁵. El AH se encuentra presente en muchos organismos en la sinovia, el humor vítreo y el tejido conjuntivo colágeno, En lo que respecta a los seres humanos, está presente en altas concentraciones en articulaciones, cartílagos y piel. La cantidad de AH, en una persona de 70 kg, se habla de tener presente alrededor de unos 15 gramos de ácido hialurónico en el total de su cuerpo; además, un tercio se degrada y sintetiza todos los días¹.

Figura 22. Estructura de ácido hialurónico y el enlace de unión entre el ácido D-glucurónico y la N-acetil-glucosamina



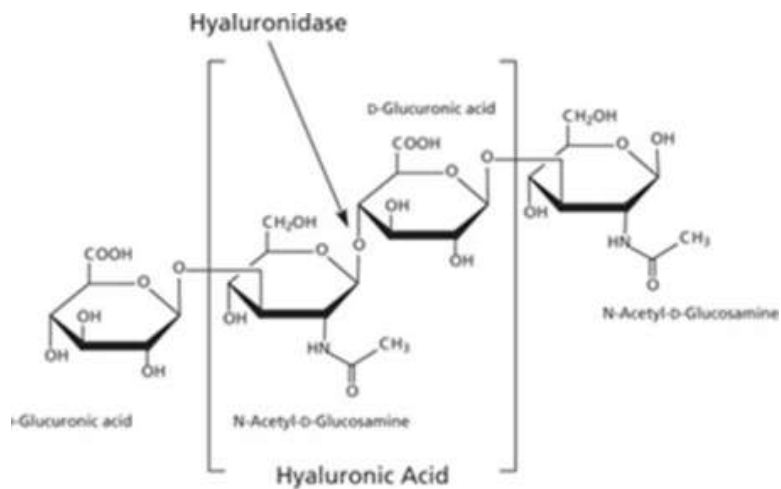
Fuente: Pérez⁴⁶

El ácido hialurónico se considera como un glicosaminoglicano que no es sulfatado, el cual posee una carga negativa y con un alto peso molecular⁴⁷, además de otras características como las que se presentan a continuación:

(...) está ubicado primordialmente en la matriz extracelular (MEC), pero también ha sido localizado en el citoplasma, núcleo y nucléolo, modificándose en un polímero con una colaboración excepcional en varios procesos metabólicos, desde la fertilización hasta el crecimiento y metástasis tumoral, se ha encontrado especialmente en el tejido conectivo de la mayoría de los vertebrados, también se encuentran en las cápsulas de algunas bacterias. La estructura química del ácido hialurónico consiste de unidades repetitivas de disacáridos unidos por enlaces glicosídicos β -1,4. Cada unidad disacárida está formada por ácido D-glucurónico (AcGlcU) y ácido N-acetil-D-glucosamina (AcGlcN) conectados por enlaces glicosídicos β -1,3⁴⁷. (Ver Figura 23)

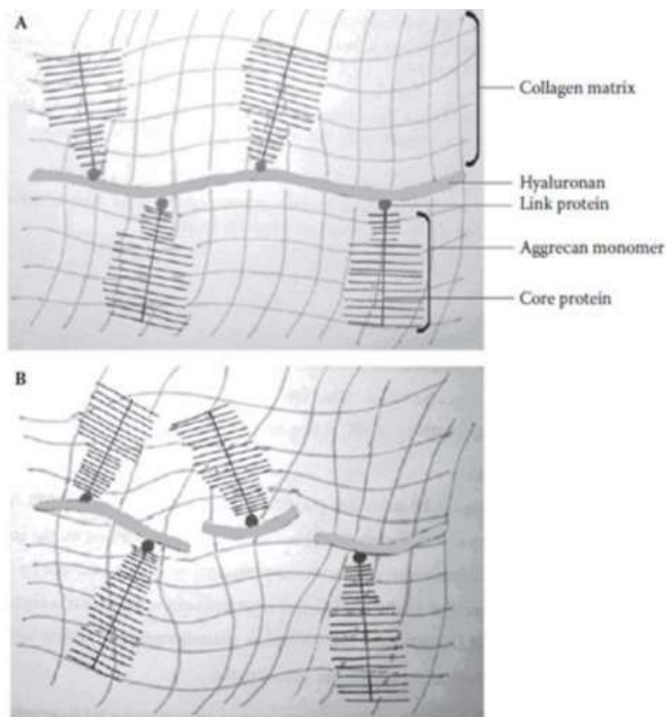
También, los polímeros que pertenecen al ácido hialurónico son un constituyente unido presentes en varios lugares del organismo como: matriz extracelular, cartílago, tejidos conectivos, líquido sinovial, tejidos y piel. Los mencionados polímeros conciernen al ácido hialurónico y a sus subsiguientes productos de degradación, intervienen en desarrollos celulares como lo son: “diferenciación celular, la progresión tumoral, los procesos inflamatorios, la adhesión celular, la angiogénesis, la señalización, los daños en los tejidos y los mecanismos de reparación”⁴⁷. (Ver Figura 24)

Figura 23. Composición del ácido hialurónico por N-acetil- D-glucosamina y ácido D-glucurónico alternantes y representación de la hialuronidasa



Fuente: Delgadillo⁴⁷

Figura 24. Esquemas de una matriz extracelular intacta (A) y diseminada (B) después de la actividad de la hialuronidasa



Fuente: Castaño *et al.*⁴⁸.

Con todo lo anteriormente expuesto, se da la certeza de que el ácido hialurónico es una sustancia que se encuentra presente en el organismo de manera natural, y que se localiza mayormente en la piel de las personas, el cual se puede utilizar en muchas áreas y ámbitos de la salud, estética, industria cosmética, debido a que en el proceso natural de envejecimiento la cantidad de esta sustancia poco a poco se va reduciendo, y al cuerpo no le resulta fácil volver a regenerarla.

2.7.1 Tipos de ácido hialurónico

Es de suma relevancia que se tenga presente que no todo ácido hialurónico es igual, ya que existen diferentes clasificaciones de los tipos de ácido hialurónico, sobre todo cuando se utilizan en tratamientos específicos los cuales se basan en su peso molecular, pureza, grado cosmético, inyectable, entre otros. La unidad de medida para la clasificación de peso molecular es el Dalton; se dice que aquellos que poseen un peso molecular entre 500 kDa se consideran de bajo peso molecular y cuando son de 2000 kDa son de alto peso molecular⁴⁸.

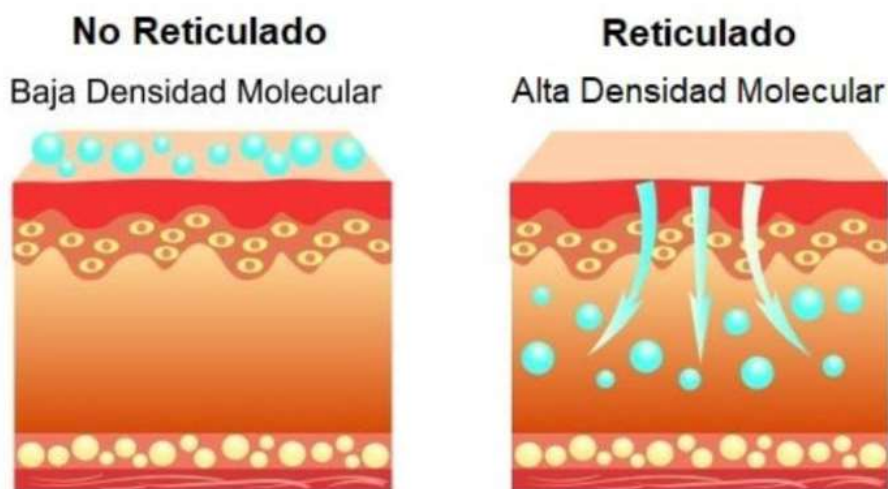
Por otra parte, otros investigadores clasifican más detalladamente los tipos de ácido hialurónico⁴⁸, como:

- Alto peso molecular (>1mDa).
- Bajo a medio peso molecular (50-300 kDa).
- Muy bajo peso molecular (<50kDa).
- Ácido hialurónico reticulado.
- Otros ácidos hialurónicos o especiales.

También existe otra clasificación sobre los tipos de ácido hialurónico y se pueden caracterizar por su estructura molecular, donde las moléculas se enlazan entre ellas mismas y forman una especie de malla o red. Si el ácido es más reticulado, mayor densidad y durabilidad va a poseer. (Ver Figura 25). Esto quiere decir que tiene una proporcionalidad directa con respecto a la reticulación y densidad, siendo así que se vaya a determinar el resultado en cuanto a si serán más perdurables. De esta manera, si se genera un enlace durable entre las moléculas, el ácido reticulado mostrará un volumen mucho más superior,

pero con el no reticulado sucede lo contrario, ya que los resultados no serán tan duraderos; sin embargo pueden útiles para conservar en la rutina⁴⁹.

Figura 25. Tipos ácido hialurónico según su densidad



Fuente: Díaz⁴⁹

Desde otro punto de vista, muchos autores clasifican a los tipos de rellenos de ácido hialurónico como bifásico (posee 2 diferentes tipos de ácido hialurónico, uno reticulado y otro no reticulado que se utiliza como lubricante) y monofásico, con respecto a este último a la vez puede dividirse en monodensificados y polidensificados. El gel monofásico es procedente de la diversificación de la cantidad de ácido hialurónico de alto y bajo peso molecular, y todo el ácido hialurónico es reticulado²⁸.

2.7.2 Síntesis y degradación del ácido hialurónico

Existen moléculas de glicosaminoglicanos, en los que el lugar donde ocurre la síntesis es en el aparato de Golgi, mientras que el ácido hialurónico es sintetizado por enzimas transmembrana, específicamente en tres: ácido hialurónico sintetasa 1 (HAS1), 2 (HAS2) y 3 (HAS3); esto sucede en la parte interior de la membrana plasmática, luego se transloca al espacio extracelular con la cadena polimérica mediante un poro de estas estructuras y en

comparación con otros glicosaminoglicanos que se forman internamente en el aparato de Golgi, y después se secretada mediante exocitosis. Las tres enzimas comparten entre 50-70% de su secuencia y son codificadas por diversos genes situados en diferentes cromosomas⁴⁴.

El lugar donde se genera la síntesis de esta molécula es en la cara citosólica de la membrana plasmática, aquí es donde se van enlazando los monosacáridos; esto ocurre y conforme se va sintetizando la cadena de ácido hialurónico se traslada al espacio extracelular. No obstante, como ya se mencionó anteriormente, las tres enzimas sintetizan ácido hialurónico, pero la enzima HAS2 es la que crea las cadenas más largas. Llama la atención que existe un gen equivalente al de la enzima HAS1 que se localiza en ciertas bacterias, y estas lo sintetizan con el fin de poder incrementar su movimiento⁵¹.

El ácido hialurónico, que se encuentra en el torrente sanguíneo, es catabolizado en los ganglios linfáticos y en el hígado; por otro lado, el AH que se localiza en los tejidos se degrada externamente de la célula mediante la hialuronidasa, las especies reactivas de oxígeno, el superóxido, el óxido nítrico y el peroxinitrito, formados en tejidos inflamados o lastimados. En los seres humanos, se han logrado reconocer seis hialuronidasas (Hyal) distintas, las cuales corresponden a: Hyal-1, Hyal-2, Hyal-3, Hyal-4, PH-20 y Hyalp-1⁴⁴.

La vida media del ácido hialurónico es de uno a dos días antes de que ocurra la degradación enzimática. No obstante, esto se puede tratar de cambiar mediante entrelazamientos para optimizar su resistencia. Es interesante que los rellenos reticulados no animales son bastante soportados por el organismo, y esporádicamente originan reacciones adversas; la duración de este tipo de rellenos es de tres a doce meses²⁷.

El ácido hialurónico, que se encuentra en los tejidos que están bien drenados por vasos linfáticos, se elimina mediante la vía linfática, mientras que, si el espacio de vaciado no puede seguir la linfática, se puede usar la vía hemática a partir de donde pasa a la sangre, y es degradado principalmente por células endoteliales de los capilares sinusoidales, y esto ocurre en el hígado; en suma, el 30% del ácido hialurónico es excretado por medio del hígado. Cierta porción del AH de igual forma se evacua en los nódulos linfáticos, y el 1% es eliminado todos los días mediante los riñones⁵¹.

2.7.3 Aplicaciones médicas del ácido hialurónico y sus derivados a

El Ácido Hialurónico (AH) ya se ha logrado definir anteriormente como un polisacárido natural y, además, es uno de los constituyentes más primordiales que tiene la matriz extracelular. Debido a su prominente capacidad de higroscopicidad, que quiere decir que puede retener elevadas cantidades de agua, así como también posee características de mucoadhesividad, biocompatibilidad, biodegradabilidad y ausencia de inmunogenicidad. Gracias a todas estas propiedades del compuesto mencionado, el AH es un elemento bastante interesante para diferentes usos y diversas aplicaciones en áreas diversas como la Medicina, la Farmacia, los Alimentos y en la parte cosmética también³.

El ácido hialurónico, al ser biocompatible y aprovechado en los seres humanos, tiene diferentes aplicaciones y hace que en la actualidad sea un centro en la investigación. Resumidamente, en el cáncer de pulmón disminuye la expansión de células tumorales y aumenta la recreación de tejido sano; además, se usa como tratamiento en la artritis, porque regenere el cartílago de las articulaciones. En suma, el ácido hialurónico también se utiliza en tratamientos estéticos, con efectos positivos, y otro uso importante es su aplicación para el ojo seco, que existen en presentaciones de gotas para hidratar⁵¹.

El Ácido Hialurónico (AH) también es un agente humectante, lo cual hace que pueda atraer agua; este ha sido utilizado para tratamientos estéticos, como por ejemplo en: “líneas nasolabiales, mesolabiales, aumento del volumen de los labios y líneas glabellares con porcentajes altos de satisfacción de los pacientes”²⁷. En la piel de las personas con fotoenvejecimiento, se ha observado que los fibroblastos están colapsados por la pérdida de tensión mecánica, en comparación con aquella población con fotoprotección²⁷.

Esta problemática de los fibroblastos se puede corregir mediante la aplicación de inyecciones con materiales de relleno. En pieles fotoenvejecidas y envejecidas, que se han sometido a tratamientos con ácido hialurónico, se ha notado que intensifican la producción de procolágeno tipo I in vivo. Asimismo, existe evidencia de que la introducción de ácido hialurónico, mediante inyección, incentive que los fibroblastos causen la inhibición tisular

de metaloproteinasa de matriz I (TIMP-1) y otras acciones de interés en estos procesos²⁷.

Los atributos que contiene el AH en cuanto a viscoelasticidad, actividad fisiológica y biocompatibilidad, hacen que sea un instrumento prototipo para la utilización farmacológica, especialmente en oftalmología, reumatología y dermatología. Al mismo tiempo, la transformación química de las moléculas provoca biomateriales establecidos en AH biocompatibles y biodegradables, considerablemente manejados para el tratamiento de heridas y para la ingeniería de tejidos⁴⁴.

Además, el ácido hialurónico se caracteriza bastante por sus propiedades en las aplicaciones médicas, pero como bien se sabe, no solamente en esta área es aplicable. En la industria cosmética tiene bastante interés por este tipo de compuestos, ya que es utilizado en el aumento de tejidos blandos, y es uno de los procedimientos estéticos más populares. Los rellenos de AH han evolucionado y se considera como el material de elección, por su simplicidad en la utilización, baja inmunogenicidad, reversibilidad, y longevidad⁵⁰.

Los usos clínicos estéticos de los rellenos de AH son comúnmente aplicados en áreas como los labios, en las líneas finas superficiales, en el surco nasolabial o canal de desgarró, también utilizados como potenciadores de la piel y en microinyecciones. Todo esto con diferentes técnicas de inyección, según la experiencia y fundamentada en la literatura, estas técnicas van a depender de las características del paciente, así como también del médico tratante, por su experiencia y la predilección⁵⁰.

A continuación, se explicarán ampliamente algunas de las aplicaciones del ácido hialurónico en las áreas de la Medicina y Farmacia, que son de gran interés en este proyecto de investigación. Cabe resaltar que estos no son todos o los únicos usos que se le pueden dar a este elemento tan relevante en la actualidad, y que son muy novedosos sus usos, porque la gran mayoría tiene evidencia clínica.

2.7.3.1 En la osteoartritis y en la regeneración del cartílago

Como bien se sabe, el ácido hialurónico se encuentra de forma natural en el organismo, ya que hace parte del tejido conectivo, de los tendones y ligamentos; a la vez,

posee propiedades viscoelásticas. Funciona para múltiples acciones; por ejemplo, puede actuar como lubricante y amortiguador y, por otro lado, también como vehículo de nutrientes para las articulaciones. Existe evidencia científica sobre suplementos alimenticios, donde se asegura que poseen eficacia demostrada de productos de ácido hialurónico ingeridos por vía oral para calmar el dolor de rodilla⁵².

La osteoartritis es una enfermedad que daña todo el sector articular; en el tratamiento tradicional para tratarla se utiliza para el dolor analgésicos y antiinflamatorios no esteroideos (los AINE) que pueden ser de gran ayuda, pero sus efectos adversos y toxicidad es un tema muy relevante en este tipo de fármacos. Es debido a esto que el ácido hialurónico y los biomateriales derivados de esta sustancia constituyen un progreso demostrativo en la terapia de la osteoartritis, cuando fue propuesta en 1971 por Endre A. Balaz para el tratamiento de la artritis en caballos y humanos⁴⁴.

El proceso natural del envejecimiento de la piel y de los cartílagos, la cantidad presente de ácido hialurónico, así como su peso molecular promedio, suelen descender. Estas alteraciones en la concentración causan una disminución de elasticidad y viscosidad de los tejidos, especialmente del líquido sinovial. La gran mayoría de AH que se localiza en la articulación se constituye de 12 500 unidades de disacáridos, que le suministran a la molécula un peso de alrededor de 5 000 kDa. En la osteoartrosis, las cantidades se van a reducir desde la mitad hasta un tercio de su valor estándar, lo que conlleva al deterioro de la lubricación de la articulación y provoca que el cartílago se torne más susceptible a los traumatismos⁵³.

En 1980, fueron propuestos diversos derivados de AH para inyecciones intraarticulares, con el fin de restablecer la homeostasis del líquido sinovial dañado y para resguardar el cartílago articular del deterioro mecánico. Las preparaciones a base de AH llamadas Synvisc (Hyalan G-F20) y Hyalgan, en específico, se utilizaron mucho en los ensayos clínicos. Las dos fueron seguras y efectivas; sin embargo, por lo regular se requieren varias inyecciones. Asimismo, el resultado de Hyalgan y Synvisc se considera con mayor duración, por lo que la molécula podría interactuar con los receptores de membrana⁴⁴.

La inyección de hialuronato por vía intraarticular fue utilizada por primera vez para el tratamiento de la artritis de los caballos de carreras; debido a que el resultado tuvo un efecto positivo, se siguió utilizando en la veterinaria y se continuó con la ardua investigación acerca de sus consecuencias en los humanos. Los estudios clínicos terapéuticos primarios realizados en los humanos, en la patología de la osteoartritis de la rodilla, fueron detallados por Rydell & Balazs y Peyron & Balazs, y luego en los siguientes años por Weiss y otros investigadores⁵³.

Conforme han pasado los años y las investigaciones que se han realizado con respecto a este tema, ya no solo se interesan en saber si este compuesto es factible terapéuticamente en el uso de esta enfermedad, sino que además de esto, se investigan los tratamientos en las condiciones óptimas, en cuanto a la frecuencia y el número de inyecciones, y también si el peso molecular del hialuronato que es inyectado tiene participación significativa en su efectividad⁵³.

Finalmente, las inyecciones de ácido hialurónico por la vía de administración intraarticular, pueden ser un procedimiento bastante provechoso para tratar el alivio del dolor y el restablecimiento de la funcionalidad, que en términos de seguridad y eficacia es bastante acertado en diversas patologías en relación con las articulares. No obstante, aún no están evidentes los aprovechamientos en cuanto a la rigidez de la articulación, debido a que no existen similitudes en los resultados⁵³.

2.7.3.2 Oftalmología

El ácido hialurónico en el cuerpo vítreo del ojo, la película lagrimal, el epitelio corneal y la conjuntiva, realiza un papel importante siendo un elemento relevante. Es por esto por lo que aquella molécula expuesta inicialmente por Balazs, en el año 1980, como un instrumento viscoquirúrgico que suple el líquido vítreo perdido en la realización de procesos quirúrgicos oftálmicos, ampara la herida mecánica, estableciendo y conservando el espacio para la manipulación quirúrgica⁴⁴.

El AH en la oftalmología se puede aplicar en procedimientos quirúrgicos en el ojo, debido a que:

El AH se encuentra de forma natural en la matriz extracelular del humor acuoso y vítreo, esta solución protege tanto las células endoteliales corneales como otras estructuras oculares. La sal sódica de un mucopolisacárido de alto peso molecular es la que se presenta como una solución viscosa, pero no antigénica. Su aplicación en el interior del ojo durante una cirugía facilita la separación de los tejidos y los protege de cualquier traumatismo quirúrgico que pueda llegar a ocurrir. El hialuronato de sodio durante la cirugía funciona para restablecer el volumen intraocular, ayuda en la separación de membranas adheridas a la retina, a manipular los desprendimientos de retina y aplanar mecánicamente la misma⁵¹.

Ya para el año de 1982, un procedente del ácido hialurónico propuesto como Healon[®], se encontraba disponible en la parte comercial para su utilización en aplicaciones a nivel oftálmico, y se ha usado constantemente como un instrumento terapéutico en muchos de los procedimientos quirúrgicos en operaciones oftálmicas. Asimismo, aparte del Healon, existen otras elaboraciones de ácido hialurónico que se encuentran vigentes en el mercado para procedimientos oftalmológicos⁴⁴.

Una de las opciones para el tratamiento del ojo seco, que es una patología de carácter oftalmológico muy habitual, donde se produce una alteración en la superficie de la córnea y la conjuntiva, en la mayoría de los casos se utilizan las lágrimas artificiales, debido a que el área del ojo no se encuentra lubricada por la falta de lágrimas y ocasiona molestias oculares, problemas en la visión y lesión en estas partes que se ven directamente afectadas; de estas gotas hay mucha diversidad en el mercado, con diferencias desde sus principios activos y hasta en sus conservantes⁵¹.

Existen dos tipos de lágrimas artificiales que se ha demostrado ser las mejores para los pacientes en el tratamiento del ojo seco, las cuales son: hialuronato sódico y alcohol polivinílico; este último tiene características importantes como reducir la tensión superficial del agua, ampliar su estabilidad, es compatible con bastantes fármacos oftalmológicos y posee baja toxicidad epitelial. Por otro lado, el ácido hialurónico tiene una propiedad pseudoplástica que les proporciona a las soluciones una alta viscosidad y les permite adherirse bien al epitelio corneal. Además, según estudios, el hialuronato sódico es mejor en este tratamiento que el alcohol polivinílico⁵¹.

Debido a las propiedades viscoelásticas que contiene este elemento, les brinda a las disoluciones acuosas de AH el poderse utilizar en productos como colirios lubricantes, y también para preservar el área del ojo correspondiente a la córnea de la resequeidad en el procedimiento del síndrome del ojo seco, que esta patología origina variaciones visuales e inestabilidad de la película lagrimal⁴⁴.

La evidencia clínica del uso del AH como tratamiento en el síndrome del ojo seco existe, debido a que varios estudios in vivo e in vitro corroboraron su seguridad y eficacia. Ya que este producto le suministra una mejor lubricación ocular, este compuesto además presenta la capacidad para optimizar el atributo de hidratación en la lente de contacto, y últimamente se ha presentado una solución de derivado de AH con un bajo peso molecular para perfeccionar su hidrofiliidad, tanto así que, en un estudio comparativo, este puede aumentar la humectabilidad de forma más eficaz, en comparación con otros agentes⁴⁴.

Además, el ácido hialurónico también se aplica en el suministro de fármacos oftálmicos por vía tópicos, tales como los antimicrobianos y los agentes antiinflamatorios, para extender su permanencia ocular y, con esto, causar un efecto activo. En efecto, los agentes tópicos que se aplican en el ojo se drenan ligeramente y, si a los medicamentos se les combina el AH, podría ser que se module la posología a administrar⁴⁴.

El mezclar las soluciones acuosas con el ácido hialurónico provoca que estas se vuelvan con características de alta viscosidad, y debido a esto son mejores para la acción de lubricar el ojo; a esta propiedad se le conoce como capacidad pseudoplástica. Posee, además, una amplia adherencia a lo que es el epitelio corneal; esto le concede que las soluciones no circulen con facilidad, haciendo que las soluciones se prolonguen con respecto al tiempo de su permanencia en la superficie del ojo⁵¹.

2.7.3.3 Piel

El AH se relaciona ampliamente con la reparación, aunque aún no se han aclarado detalladamente los mecanismos por los cuales afecta la reparación. Se ha logrado

evidenciar que el ácido hialurónico realiza un papel fundamental en las fases inflamatorias, proliferativas o de remodelación en el transcurso de mejoría de la piel. Ya que posee características antiinflamatorias o proinflamatorias, esto se relaciona con su peso molecular⁴⁴.

Concretamente, el mecanismo del ácido hialurónico para trabajar en la piel es debido a que se acopla a los receptores de queratinocitos CD44; esto hace que se dé su diferenciación y así ampliar su motilidad. Debido a esto y a muchas otras características conocidas del ácido hialurónico como la buena biocompatibilidad, biodegradabilidad, durabilidad y ausencia de toxicidad, muchos autores en la actualidad se han interesado mucho en los usos de ciertos productos que están hechos a base de AH, así como también en la ingeniería de tejidos de la piel y en la medicina regenerativa⁴⁴.

En cuanto a la cicatrización, el ácido hialurónico realiza un papel esencial en cada fase de esta, y también regulariza la organización y el metabolismo de la matriz extracelular. Opera en diferentes ocupaciones hidrodinámicas tisulares, como, por ejemplo: migración celular, proliferación de fibroblastos y maduración de las fibras, diferenciación y conexión celular en la reparación de lesiones, morfogénesis celular y modulación de la angiogénesis. Varios de dichos procedimientos son fundamentales para la cicatrización y regeneración de tejido, con un microambiente apropiado⁵⁴.

También existen combinaciones de este compuesto con otros productos; por ejemplo, con hidrogel, porque en un estudio se evidenció que la herida cerró rápidamente mediante la reepitelización, y también ocurrió una depreciación de la contracción de la herida. Gracias a la evidencia de los estudios informados, el gran campo donde se puede aplicar el ácido hialurónico en las etapas de curación de la piel se muestra en evidencia. El AH y sus derivados han sido estudiados solos o en combinación con otras moléculas, para proporcionar la cicatrización de lesiones de la mejor manera, al intervenir en los procesos proliferativos, de remodelación y angiogénicos⁴⁴.

La regeneración de tejido necesita que el microambiente sea el óptimo, para reponer las propiedades iniciales de la estructura celular y conseguir la mejor calidad cicatricial del

tejido⁵⁴. También participa en otros procesos (resumidos en la Figura 26); por ejemplo, en la fase de coagulación, el ácido hialurónico:

(...) aumenta su síntesis y disminuye su degradación, acumulándose un ácido hialurónico con una cadena larga, elaborado por las plaquetas, con capacidad de ligarse al fibrinógeno y así favorecer la formación del coágulo inicial. Este AH de cadena larga crea edema para permitir la infiltración celular y abre espacios tisulares, facilitando la llegada de los PMN a la herida, para la eliminación de microorganismos y de restos tisulares⁴⁰.

Figura 26. Funciones del Ácido hialurónico en la cicatrización

FASE INFLAMATORIA
Se une al fibrinógeno para iniciar la cascada de coagulación
Crea edema para permitir la infiltración celular
Favorece la migración de células inflamatorias
Induce producción de citocinas proinflamatorias
Efecto protector frente a los radicales libres de oxígeno
Moderador de la respuesta inflamatoria a través de las proteasas
Efecto Bacteriostático y antiadherente bacteriano
FASE PROLIFERATIVA
Quimiotaxis de fibroblastos al sitio de la herida
Rellena las lagunas de la MEC recién formada, creando amortiguación y organización estructural del tejido de granulación
Estimula la angiogénesis
Promueve la migración y proliferación de los queratinocitos
FASE DE REMODELACIÓN
Contribuye a la cicatrización normal.
Previene el acúmulo de colágeno patológico

Fuente: Hernández⁵⁴

Asimismo, al ácido hialurónico, gracias a sus diversos papeles en cuanto a la hidratación, lubricación y estabilización celular, se le considera como una gran opción en el tratamiento del proceso de envejecimiento facial. Asimismo, se han aplicado durante varios años como relleno para el llenado de tejidos blandos, con el fin de subsanar depresiones en piel, arrugas y pliegues en piel. (Ver Figura 27). Se sabe que en la vejez y en el acercamiento a esta etapa ocurre una disminución de las cantidades de AH, ya que involucra una contracción de la matriz extracelular y un descenso de su viscosidad, además de una transformación en el nivel de difusión de iones y macromoléculas desde la sangre a los tejidos e inversamente⁵¹.

Figura 27. Resultados obtenidos luego de un tratamiento antiarrugas con ácido hialurónico



Fuente: Macías⁵¹

2.7.3.4 Tejido vascular

El ácido hialurónico es de suma relevancia en el tejido vascular, debido que ha logrado manifestarse de forma activa en la migración y activa macrófagos tisulares y neutrófilos; cuando ya han sido activados, producen factores angiogénicos y mitogénicos, que son fundamentales para la formación del tejido de granulación que se necesita como inicio de la angiogénesis. Es debido a esto que el ácido hialurónico se ha utilizado recientemente en la ingeniería de tejidos vasculares para varias aplicaciones diversas⁴⁴.

En muchas investigaciones, el AH ha sido planteado como un factor promotor de la endotelización del injerto vascular y del sustituto vascular. Otros análisis sobre la temática de injertos vasculares se concentraron en la hemocompatibilidad de AH, y experimentaron su rendimiento cuando se mezcla con otro material. Ya se ha mencionado que el ácido hialurónico disminuye la coagulación y la activación plaquetaria; es debido a esto que este material es bastante bueno como posible candidato para injertos cardiovasculares⁴⁴.

Otro empleo en la ingeniería de tejido vascular para el ácido hialurónico puede ser figurada por: “la promoción de tejido vascularizado y la formación de microvasos para terapia de isquemia de tejido, reemplazo de tejido o incluso para modelos de fábrica de fármacos”³⁸. Los hidrogeles poseen características mecánicas idóneas para elaborar tejidos densos vascularizados in vitro. Se ha logrado verificar que los procedentes de ácido hialurónico con un bajo peso molecular dentro del hidrogel a base de gelatina originan la motilidad de las células endoteliales⁴⁴.

Finalmente, el ácido hialurónico probablemente se podría utilizar en terapias basadas en células, como se demuestra a continuación:

Un estudio in vivo e in vitro que investiga el papel de HA en la diferenciación de células madre embrionarias hacia un linaje de células de músculo liso ha demostrado que la remodelación del microambiente de HA es un paso fundamental para dirigir la diferenciación de células madre hacia un linaje vascular, lo que sugiere un papel potencial de HA para el tratamiento de enfermedades vasculares⁴⁴.

2.7.3.5 Nervio periférico

En la ingeniería de tejidos de nervios periféricos se ha utilizado el ácido hialurónico, ya que sirve en el crecimiento nervioso, la diferenciación y la proliferación en diversos sustratos. Los hidrogeles con ácido hialurónico manifestaron que pueden optimizar las tasas de supervivencia y la proliferación de precursores neurales, debido a que regeneran los nervios periféricos y potenciales terapéuticos para el Sistema Nervioso Central (SNC); estos hidrogeles poseen propiedades biológicas y mecánicas competentes para provocar la diferenciación y la proliferación de antecesoros neuronales⁵⁵.

Los hidrogeles de ácido hialurónico manifestaron la propiedad de optimizar las tasas de supervivencia y la proliferación de precursores neurales, exponiendo que existe una gran posibilidad para lo que es la regeneración de nervios periféricos y potenciales terapéuticos en cuanto al SNC. Agregado a esto, como ya se mencionó, los hidrogeles de AH poseen características biológicas y mecánicas que son idóneas para incitar la diferenciación y proliferación de progenitores neurales; esto hace que se le abra paso a aquellas terapias encaminadas a patologías neurodegenerativas⁴⁴.

Además, el ácido hialurónico se podría combinar con biopolímeros naturales, importantemente con el colágeno, debido a que posee una naturaleza parecida entre ambos biomateriales. Asimismo, el AH también puede tener un papel importante en lo que es la terapia de la lesión de los nervios periféricos, cuando se utiliza como hidrogel o en conjunto con moléculas naturales o con polímeros sintéticos; por consiguiente, se afirma la cualidad adicional agregada de poder interactuar con factores de crecimiento determinados implicados en la regeneración de los nervios periféricos⁴⁴.

2.7.3.6 Tejido adiposo

Existe la necesidad en la parte clínica de restauración de los tejidos blandos por quemaduras profundas o algún trauma, por ejemplo, puesto que ha sido un gran reto para los cirujanos plásticos en la reconstrucción en las enfermedades y defectos del tejido adiposo, siendo así un crecimiento en el ámbito de la ingeniería del tejido adiposo, con la siembra de precursores de adipocitos basados en ácido hialurónico para generar nueva grasa. Aquellos deterioros del contorno, por la extracción de tumores y de golpes o

anomalías innatas, no afectan únicamente en la parte física de los pacientes, sino que pueden perturbar la función también, y de ahí la importancia de la restauración del tejido adiposo⁵⁶.

En estudios al utilizar un injerto de armazón sembrado de preadipocitos basado en AH, la mayor dificultad fue la rapidez con la que se reabsorbía luego de implantar in vivo, esto por sus ya sabidas propiedades biológicas, lo cual se hizo mediante bolsas subcutáneas de personas que revelaron una supervivencia del injerto de hasta cuatro meses. Los resultados finales de este estudio mostraron que los andamios compuestos propuestos no permitían la formación de tejido adiposo con infiltración angiogénica deficiente. Luego, la investigación se desplazó hacia el aumento de las propiedades adipogénicas de los geles de HA mediante la adición de fármacos o citocinas⁴⁴.

Existen varias investigaciones con el fin de evaluar el AH en el papel del tejido adiposo y lo relacionado con este; además, se siguió estudiando en la medicina regenerativa la liberación vigilada de fármacos o de moléculas bioactivas. Además, la eventualidad de poder mezclar diversos biomateriales bioactivos también es relevante en el campo de la investigación, relacionado con la ingeniería del tejido adiposo⁴⁴.

En el estudio realizado, se pudo llevar a cabo un andamio tridimensional capacitado para estimular el desarrollo del tejido adiposo, combinando colágeno de tipo I procedente de Aquiles bovino y ácido hialurónico obtenido del humor vítreo bovino. También fue estudiada por muchos autores la mezcla entre el colágeno y elastina, para esta ingeniería del tejido adiposo. Los preadipocitos, que fueron sembrados en andamios revestidos de colágeno con elastina, manifestaron la capacidad de progreso en cuanto a la proliferación celular, la infiltración y la adhesión⁴⁴.

Finalmente, las células madre adiposas se lograron sembrar en andamios de criogel de gelatina-ácido hialurónico, y las reconstrucciones trazadas se instauraron en el bolsillo subcutáneo de dos modelos animales separados, los cuales eran: murino y porcino. En resumen, el ácido hialurónico se experimentó en diversas investigaciones de la ingeniería de tejido adiposo, tanto individualmente como combinado con otros elementos bioactivos, fármacos o citoquinas, con el propósito de impedir la rápida reabsorción⁴⁴.

2.8 Cuantificación de sustancias para uso cosmético

Dentro de las sustancias que pueden ser utilizadas para uso cosmético se encuentran los extractos, que pueden ser de diversos tipos, orígenes o procedencias; entre algunos de ellos, que se utilizan en el área de la cosmetología, se encuentran los aceites esenciales, aunque estos no se consideran como productos cosméticos, pero sí se utiliza como ingrediente en este tipo de materiales⁵⁷.

Existen diferentes maneras de identificar y cuantificar sustancias para utilizarlas en la parte de cosmética, debido a que es importante determinar aquellos compuestos químicos para luego afirmar que se pueden emplear, dependiendo de su uso en los productos. En la actualidad, esto se puede lograr mediante técnicas instrumentales, con la finalidad de evaluar en los principios activos o mezclas, ya sea para el proceso de separación, identificación y cuantificación de estas⁵⁸.

Para la parte de identificar y cuantificar los compuestos, por lo general se utilizan ciertos métodos instrumentales como: espectrofotometría UV, Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear de carbono 13 (RMN¹³C), Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detectores en conjunto con arreglo de diodos y espectrómetro de masas (HPLC-DAD-MS), Cromatografía de Gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), Resonancia Magnética Nuclear (RMN), entre otros^{58, 59}.

Además, en los cosméticos no solamente se deben cuantificar e identificar los componentes, sino que también se deben utilizar las técnicas instrumentales para la determinación de sustancias prohibidas y/o restringidas; donde también se utiliza HPLC con detectores UV, electroquímicos, espectrometría de masa. Los métodos de tipo espectroscópicos analizan la medición de la radiación electromagnética que emiten o absorben los analitos⁵⁹.

2.8.1 Cromatografía líquida

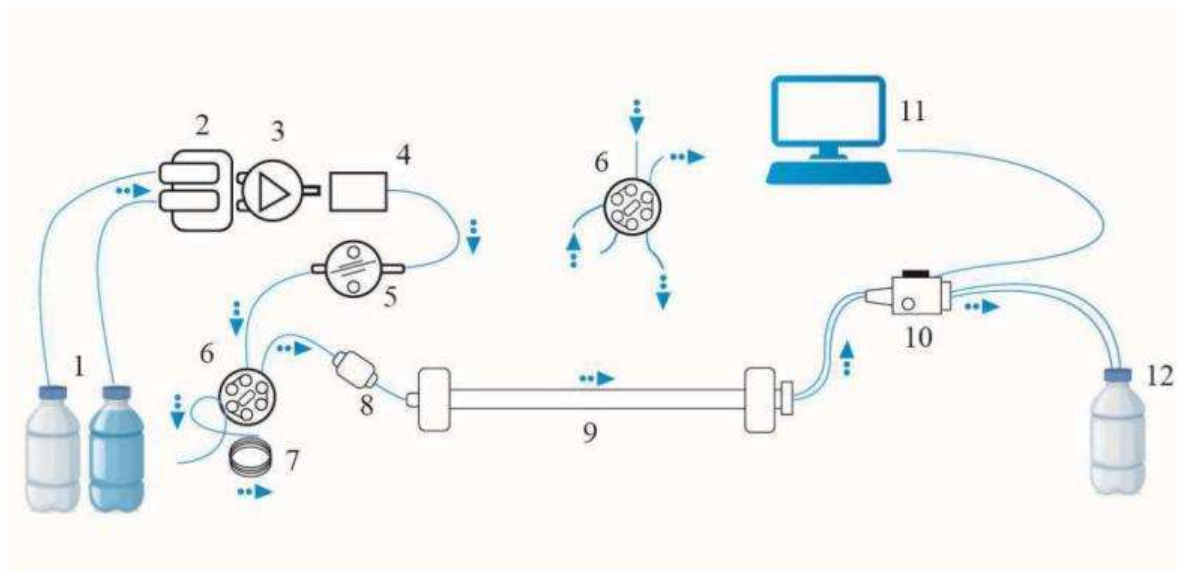
Las técnicas cromatográficas se utilizan principalmente para separar componentes de una muestra y que estos se distribuyen en dos fases, donde una es estacionaria y la otra fluye, llamada fase móvil. Se pueden separar, debido a que los solutos pueden moverse en dependencia de un equilibrio de distribución entre las dos fases establecidas, en función de sus masas, polaridad, tamaños moleculares, entre otros⁵⁹.

La cromatografía de tipo en columna es donde la fase estacionaria se encuentra en un tubo angosto, y la fase móvil pasa a través de este tubo mediante presión o gravedad. La HPLC es un ejemplo de este tipo de cromatografía; esta disminuye el tamaño de la partícula para poder disminuir el volumen interparticular y obtener una alta eficiencia resolutive, y para esto se necesita que el instrumento pueda soportar presiones altas, y que la fase móvil pase a través de la columna⁵⁹.

La HPLC, como se sabe, puede separar y analizar componentes de una mezcla, con la participación de las fases mencionadas anteriormente. Las diversas fuerzas, tanto químicas como físicas, que intervienen entre el analito y las dos fases, establecen la retención y separación de cada uno de los elementos de la mezcla. Dicha separación sucede debido a las diferencias de velocidades entre aquellos compuestos que poseen mayor afinidad a la fase estacionaria (se mueven con menor velocidad) y todo lo contrario con los que tienen menor afinidad⁶⁰. En la Figura 28 se muestran las partes que integran al equipo de HPLC, donde:

- (1) Reservorio de solventes, (2) Sistema de desgasificación, (3) Válvula de gradiente, (4) Sistema de mezclado, (5) Bomba de alta presión, (6) Válvula de inyección en “modo de inyección”, (6') Válvula de inyección en “modo de carga”, (7) Bucle de muestra, (8) Precolumna, (9) Columna, (10) Detector, (11) Sistema de adquisición de datos, (12) Desagüe⁶⁰.

Figura 28. Representación esquemática de un HPLC



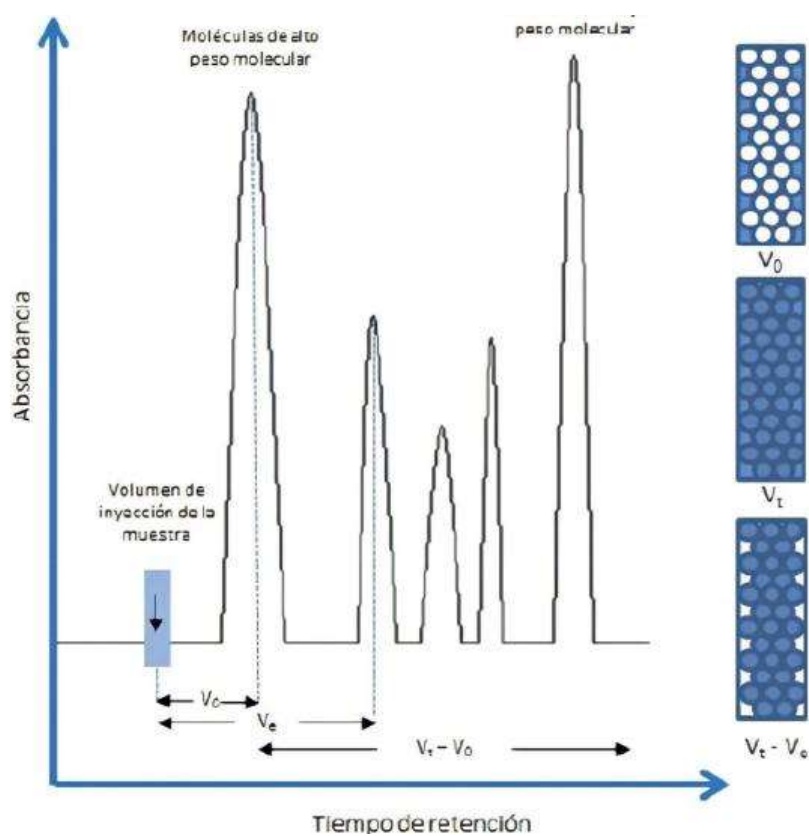
Fuente: Suarez et al.⁶⁰

2.8.2 Cromatografía líquida con exclusión de tamaño molecular.

Aquellas técnicas de cromatografía de líquidos se pueden clasificar en diferentes tipos de cromatografía; por ejemplo: “exclusión (Size Exclusion Chromatography, SEC), intercambio iónico (Ion Exchange Chromatography, IEC), interacción hidrofóbica (Hydrophobic Interaction Chromatography, HIC) y fase reversa (Reverse Phase Chromatography, RPC)”⁶¹.

El tipo de Cromatografía de Exclusión Molecular (SEC) se utiliza para la separación de biomoléculas según su tamaño y volumen que invade una molécula en solución; este delimita la capacidad de la molécula de penetrar o no en los poros de la fase estacionaria. De esta manera, las moléculas que poseen alto peso molecular son destituidas de los poros por un efecto estérico y pasan ligeramente a través de la matriz⁶¹. (Ver Figura 29)

Figura 29. Cromatografía de exclusión molecular (SEC)



Fuente: Mayolo *et al.*⁶¹

CAPÍTULO III- MARCO METODOLÓGICO

3.1 Enfoque de la investigación

En los enfoques mixtos se recogen y se examinan datos tanto cuantitativos como cualitativos, dando una interpretación final como resultado de toda la información recopilada. En aquellos enfoques que son mixtos figuran una mezcla de procesos sistemáticos, experimentales y críticos de análisis e involucran información de tipo cuantitativa y cualitativa, así como también incorporar y debatir de manera conjunta, todo esto con el fin de ejecutar deducciones de toda la información obtenida, para lograr un mejor conocimiento y entendimiento del objeto que está en investigación¹¹.

Esta investigación tiene un enfoque mixto, debido a que se pretende extraer el ácido hialurónico a partir de las membranas testáceas presentes en las cáscaras de huevo utilizando pepsina como agente hidrolizante, y hacer una evaluación tanto cualitativa como cuantitativa del compuesto extraído; además, pretende realizar un procedimiento para la extracción, y luego valorarlo cuantitativa y cualitativamente en el laboratorio de la Universidad Internacional de las Américas, en los años 2021-2022.

3.2 Diseño de la investigación

Los diseños exploratorios secuenciales, o también llamados “DEXPLOS”, tienen dos fases: la inicial, donde se recolectan y se examinan datos cualitativos; luego, la otra fase, en la que, a diferencia de la anterior, se consiguen y se estudian datos cuantitativos. Hay dos modalidades en este diseño basadas en su propósito, ya sea derivativa o comparativa. Este diseño es adecuado cuando se desea experimentar componentes de una suposición reciente, resultado de la fase inicial (cualitativa), y se intenta difundir a las muestras¹¹.

Para la modalidad del diseño exploratorio secuencial de tipo comparativa, en este aspecto, en lo que es la etapa inicial se recogen y analizan aquellos datos que son cualitativos para poder reconocer un fenómeno, y aquí se forma un repertorio o base de

datos, en el que, seguidamente, en la segunda fase se recolectan y analizan datos cuantitativos y se adquiere una nueva base de datos diferente a la de la primera situación¹¹.

El presente estudio tiene un diseño de investigación de tipo exploratorio secuencial con una modalidad de tipo comparativa, debido a que, como la investigación mixta DEXPLOS tiene dos fases: en este trabajo primeramente se va a recolectar aquella información que es de tipo cualitativa (el procedimiento teórico de extracción), para posteriormente analizar los datos que son cuantitativos, para dar una interpretación. Es de tipo comparativa, porque procura generar conocimiento del procedimiento de extracción para después integrar los datos que se obtengan en la fase de cuantificar el extracto, todo esto con el fin de interpretar y confeccionar el reporte final.

3.3 Fuentes de información

En esta investigación se utilizaron, en cuanto a la obtención de información, fuentes primarias que son conformadas principalmente por artículos científicos originales de revistas confiables e indexadas, debido a que fueron los que consiguieron reportar por primera vez el objeto de estudio en cuestión. Así como también, por otro lado, las fuentes de información secundarias, como por ejemplo artículos confiables de revisión bibliográfica, trabajos finales de graduación que se han basado en otras fuentes primarias para la creación de estos.

3.3.1 Muestra

Al ser este trabajo de investigación con un enfoque de tipo mixto, el muestreo que se realiza es uno de diseño secuencial. Para la parte de los datos cualitativos, la muestra que se hace es la de los artículos consultados, tanto de las fuentes primarias como de las secundarias, debido a que solamente es la búsqueda del procedimiento a seguir en la extracción del ácido hialurónico para poder cumplir con el primer objetivo específico; mientras que, por otro lado, para los datos cuantitativos la muestra a seleccionar es de tipo

no probabilística, para poder cualificar y también cuantificar el extracto, para determinar los valores de este.

3.3.2 Criterios de inclusión y exclusión

En cuanto a los criterios de inclusión y de exclusión, primeramente, se incluyeron todos aquellos artículos científicos, revistas indexadas, trabajos finales de graduación, libros y otros, que estuvieran en un periodo comprendido en un rango de antigüedad de los años del 2011 al 2022, en idiomas inglés o español, así como también donde la temática central tuviera una relación en sí con la extracción del ácido hialurónico, a partir de las membranas testáceas presentes en las cáscaras de huevo, y los conceptos relacionados con esta temática o para la comprensión de la misma. En los criterios de exclusión no se tomó en cuenta aquella información que no cumpliera con lo mencionado anteriormente.

Además, se tuvo presente que las cáscaras de huevo recolectadas fueran una variable por controlar; por lo tanto, el criterio de inclusión para las muestras de membranas testáceas fue de todas aquellas de la misma procedencia, y esto se realizó con la recolección de desechos de cáscaras de huevo de la panadería Grecia, donde los huevos son procedentes de la granja Don Paco, ubicada en Naranjo. A continuación, se detallan las características tanto de los huevos como de las gallinas:

Tabla 3. Propiedades de las gallinas y huevos utilizados para las muestras de membranas

Variables	Descripción
Raza de las gallinas	Hy-Line Brown.
Tipo de alimentación que reciben las gallinas	Concentrado de ponedora.
Cuidados especiales del huevo y las gallinas	Se limpian con esponjas especiales y adecuadas en seco, para evitar el ingreso de la humedad. Las gallinas se alimentan dos veces al día sin faltarles el agua para hidratación. La temperatura en la que se almacenan los huevos debe ser fresca, y los huevos no pueden

	recibir directamente la luz solar, ya que puede perder propiedades y calidad.
Recolección de huevos y transporte	La recolección de huevos es diaria, y se recoge en cartones para proceder a la limpieza, donde se vuelve a pasar a otro cartón limpio. El tiempo de recolección es diaria, de dos a tres veces al día. Se transportan en camiones cerrados.
Peso de huevos	El peso promedio de los huevos es de 61.7 g, pero puede variar, llegando a pesar hasta 130 g cada huevo.

Fuente: elaboración propia.

3.4 Unidades de análisis

Tabla 4. Operacionalización de categorías para datos cualitativos

Objetivo	Categoría de Análisis	Subcategoría	Definición Conceptual	Instrumento
Realizar un procedimiento de extracción para la obtención del ácido hialurónico a partir de las membranas testáceas presentes en las cáscaras de huevo	Procedimiento de extracción.	Hidrólisis enzimática.	Procedimiento de extracción: es un proceso donde se eliminan uno o varios compuestos, ya sea de un líquido o un sólido, donde las fases pueden ser parcial o completamente inmiscibles ⁶² .	Análisis de contenido: documentos, registros.

utilizando un método bioquímico.				
Ejecutar una evaluación cualitativa del ácido hialurónico extraído a partir de las membranas testáceas presentes en las cáscaras de huevo utilizando métodos fisicoquímicos e instrumentales.	Evaluación cualitativa del extracto.	Características del extracto	Evaluación cualitativa: en esta se evalúan actitudes, procedimientos y conceptos movilizados. manipulando herramientas de calificación, como listas de comprobación, escala estimativa y rúbricas mediante indicadores conceptuales y procedimentales ⁶³ .	Observación

Fuente: elaboración propia.

Tabla 5. Operacionalización de variables para datos cuantitativos

Objetivo	Variable	Indicador	Definición Conceptual	Definición Operacional
Determinar la cuantificación de la extracción del	Cuantificación del extracto.	% o cantidad del extracto obtenido en la extracción del ácido	Cuantificación: Expresión de la cantidad, el número o el grado de lo	Análisis de contenido

ácido hialurónico a partir de las membranas testáceas presentes en las cáscaras de huevo.		hialurónico a partir de las membranas testáceas presentes en las cáscaras de huevo.	designado por un elemento lingüístico ⁶⁴ .	
---	--	---	---	--

Fuente: elaboración propia.

La unidad de estudio en los datos cualitativos, como ya se mencionó, solamente fue basada en artículos científicos que brindaran relevancia con los anteriores procedimientos de extracción del ácido hialurónico, a partir de las membranas testáceas presentes en las cáscaras de huevo, mediante hidrólisis enzimática con pepsina. Para ello, se basó en tres artículos, especialmente los que se mencionarán brevemente a continuación.

Pérez et al.⁴⁶, en el 2018, con el artículo nombrado como “Optimization of the hyaluronic acid extraction method of the vitreous humor of *Oreochromis niloticus*”, le brindan, al presente proyecto de investigación, las diferencias entre una extracción con hidrólisis enzimática y una con hidrólisis química, y cuál de ellas es la mejor para obtener el ácido hialurónico deseado, aunque cabe destacar que el procedimiento no fue con membranas de cáscaras de huevo, sino que solo brindaba información en cuanto a las técnicas mencionadas.

Monferrer¹⁷, con su estudio acerca del “Método de obtención de un producto cicatrizante y producto cicatrizante obtenido”, en el año 2016, funciona para la presente investigación, ya que él propuso un procedimiento en cuanto a la extracción del ácido hialurónico de un hidrolizado de membranas testáceas de huevo; además, proporcionó los pasos generales de la invención, como la hidratación de las membranas, las condiciones para ello, el ataque enzimático y su posterior inactivación para luego separar por filtrado o centrifugado.

La investigación titulada como “Comparison of enzymatic hydrolysis of polysaccharides from eggshells membranes”, publicada en el 2016 por Úrgeová et al.⁶⁵, donde estas autoras proporcionan aportes a este Trabajo Final de Graduación, ya que, además de mencionar generalidades para lograr entender varios términos, también indican las proporciones de enzimas utilizadas para realizar el procedimiento (una de las cuales para la pepsina, que fue de 80 FIP-U/g DM), la especificación de la longitud de onda para la absorbancia en la lectura y otros resultados de interés.

A lo que respecta para las muestras de estudio para la parte cuantitativa, fueron las membranas testáceas de las cáscaras de huevo de gallina proporcionadas por los residuos de estas en la panadería Grecia. Durante la recolección fueron alrededor de seis semanas en total, donde cada día se limpiaban para su posterior separación manualmente, hasta obtener solamente las membranas seleccionadas.

3.4.1 Instrumento

La observación se utiliza como un método; también como instrumento, donde incluye de manera sistematizada y lógica muchas técnicas del proceso de investigación, para la obtención de información de calidad. También es usada como una herramienta de recolección de datos, mediante el registro visual, donde requiere que una persona estudie el fenómeno y contemple elementos de teoría, así como empíricos⁶⁶. En el análisis de contenido, hablando cuantitativamente, se crean categorías y se catalogan los datos que están presentes en segmentos de información⁶⁷.

Por otro lado, el análisis de contenido cualitativo tiene por objetivo recolectar un sistema de los datos, generalmente hablado, no interesa el tipo de datos que se posean; en la parte cualitativa se exploran los datos para acomodarlos en unidades y categorías de análisis para finalmente generar una teoría⁶⁸. Estos instrumentos permiten abordar los principales objetivos, categorías y variables de la investigación, ya que se puede evaluar de forma tanto cualitativa como cuantitativamente, al ser esta una investigación mixta.

Tabla 6. Equipos utilizados y materiales con el propósito de utilización en la investigación

Equipo	Fotografía	Propósito
Balanza analítica #13 ADAM Nimbus		<p>Con la balanza analítica utilizada permite determinar todos los pesos necesarios para el desarrollo de la investigación. (muestras, preparaciones, entre otros.)</p>
Estufa marca Digisystem		<p>La estufa se usa con el objetivo de secar las membranas testáceas húmedas en un tiempo y temperatura determinada, según especificaciones del procedimiento.</p>
Espectrofotómetro UV-Vis modelo 2505 #2		<p>Este espectrofotómetro UV-Vis admite que las muestras de la hidrólisis enzimática pudieran ser leídas y absorbidas a la longitud de onda específica de 525 nm,</p>

		para posteriormente proceder al equipo de HPLC.
Espectrofotómetro IR marca Agilent technologies		El espectrofotómetro infrarrojo indica los espectros de las señales de grupos funcionales presentes, comparando las muestras con el estándar, ya sean líquidas o sólidas, con el fin de detectar estas señales en ambos casos.
Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (HPLC) marca YL		El equipo del HPLC separa los componentes de las moléculas con alto peso molecular y baja volatilidad, mediante la interacción de las sustancias a analizar, permitiendo cuantificar las muestras con respecto al estándar.
Columna SEC-120 marca Xtimate		La fase móvil pasa en un flujo determinado por este instrumento que tiene la fase estacionaria, y ocurre la separación de los compuestos.

		
<p>Estándar hialurónico ácido</p>		<p>El estándar permite ser un patrón de referencia para el análisis de las muestras. Se adjunta el certificado de análisis de este.</p>

Fuente: elaboración propia.

3.5 Recolección y Análisis de Datos

3.5.1 Recolección de Datos

En la implementación del instrumento para la investigación, según cada objetivo y el método a utilizar, como primer paso se revisan los objetivos planteados, el muestreo que se aplicará para hacer un análisis en el contexto de las variables o categorías según sea el

caso, y a lo que se pretende llegar con estas en el estudio. Seguidamente, iniciar con la construcción de los pasos para lograr la extracción del ácido hialurónico, mediante la utilización de las fuentes de información mencionadas con anterioridad, esto con el procedimiento de hidrólisis enzimática, utilizando pepsina como el agente hidrolizante.

Todo esto fue hecho en la Universidad Internacional de las Américas, y en un periodo determinado, para la creación de un método que valide la extracción de este componente presente en las membranas testáceas, para proceder a realizar la cuantificación y caracterizar el extracto obtenido; además, con la ayuda de equipos instrumentales, ayudar a demostrar los resultados esperados, ya que pueden existir errores sin la adecuada formulación de cada paso si esta no se estructura de forma correcta.

Cada instrumento se aplicará según sean los datos que se requieran recoger; por ejemplo, en la construcción del procedimiento se utilizará una búsqueda exhaustiva mediante análisis de contenido en documentos, artículos, y otros. Para el segundo objetivo específico simplemente se utilizará un instrumento observacional, para alcanzar a caracterizar cualitativamente el extracto con sus debidas propiedades. Por último, se vuelve a usar el análisis de contenido, pero cuantitativamente, para determinar la cantidad de ácido hialurónico que se puede extraer de las cáscaras de huevo, específicamente de las membranas testáceas.

Se deben definir los días para la ejecución y el periodo de duración en la Universidad Internacional de las Américas, con un horario a convenir por ambas partes, sobre todo por la situación actual de la COVID-19, que está afectando al país y al mundo en general. Luego, determinar el proceso para la codificación de las variables, según lo que se responda, para una simplificación en análisis de los resultados, y posteriormente lograr un informe final para la conclusión del trabajo realizado.

Tabla 7. Cronograma de tareas experimentales para cada objetivo a cumplir con fechas tentativas

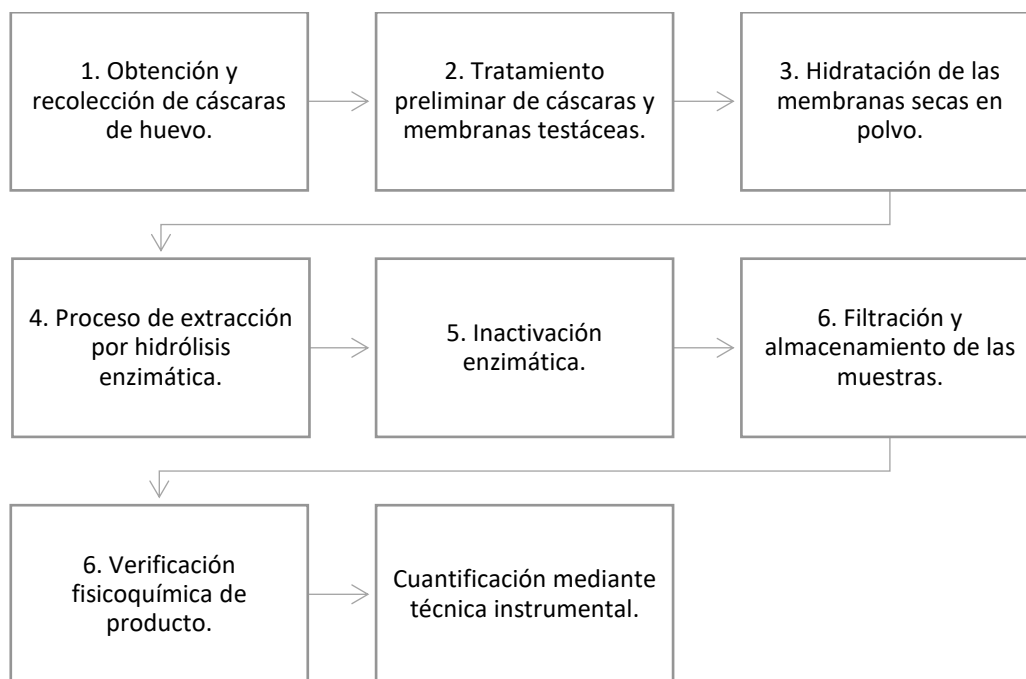
Tarea por realizar	Objetivo por cumplir	Fecha máxima tentativa	Cantidad de semanas

Diagrama de pasos para obtener el procedimiento	1. Realizar un procedimiento de extracción para la obtención del ácido hialurónico a partir de las membranas testáceas presentes en las cáscaras de huevo utilizando un método bioquímico.	Semana 10 (3C-2021) 08/11/2021- 12/11/2021	1
Listado de materiales, equipo, cantidades, y otros. para presentar al laboratorio.	1. Realizar un procedimiento de extracción para la obtención del ácido hialurónico a partir de las membranas testáceas presentes en las cáscaras de huevo utilizando un método bioquímico	Semana 12 (3C-2021) 15/11/2021- 26/11/2021	2
Planificar días disponibles para empezar proyecto.	1. Realizar un procedimiento de extracción para la obtención del ácido hialurónico a partir de las membranas testáceas presentes en las cáscaras de huevo utilizando un método bioquímico	Semana 12 (3C-2021) 26/11/2021	1
Elaboración del proyecto, realizar el procedimiento	1. Realizar un procedimiento de extracción para la	Semana 13 (3C-2021) 29/11/2021-	8

planteado.	obtención del ácido hialurónico a partir de las membranas testáceas presentes en las cáscaras de huevo utilizando un método bioquímico	03/11/2021 Semana 1 (1C-2022) 24/01/2022- 21/01/2022	
Elaboración del proyecto, cuantificar extracto.	3. Cuantificar el ácido hialurónico extraído a partir de las membranas testáceas presentes en las cáscaras de huevo.	Semana 3 (1C-2022) 31/01/2022- 04/02/2022	2
Elaboración del proyecto, describir cualitativamente el extracto mediante métodos fisicoquímicos e instrumentales.	2. Evaluar cualitativamente el ácido hialurónico extraído a partir de las membranas testáceas presentes en las cáscaras de huevo utilizando métodos fisicoquímicos e instrumentales.	Semana 5 (1C-2022) 14/02/2022- 18/02/2022	2

Fuente: elaboración propia.

Figura 30. Esquema resumen del proceso de extracción y verificación del ácido hialurónico



Fuente: elaboración propia.

3.5.1.1 Materia prima y tratamientos preliminares

Los residuos de las cáscaras de huevo de gallina fueron proporcionados por la panadería Grecia, donde el proveedor de estos elementos es la granja Don Paco, ubicada en el sector de Naranjo, en la provincia de Alajuela. Al conocer la procedencia de estos desechos y saber el origen y formación del producto, se puede garantizar que la materia prima es homogénea en cuanto a su composición química, debido a que la alimentación de estas gallinas es la misma. También, debido a los procesos de limpieza y desinfección propios de la granja, los huevos no poseen presencia de contaminantes como las heces de gallina o de la tierra de criadero; entonces, además se asegura que los residuos de cáscaras de huevo no tengan estos contaminantes.

Las membranas testáceas que fueron separadas de las cáscaras de huevo manualmente de los residuos fueron lavadas previamente con agua potable, con la finalidad

de limpiar restos de albumina, yema y otros residuos, donde luego fueron secadas a temperatura ambiente, y se recolectaron en bolsas plásticas con cierre hermético, para su posterior secado en el laboratorio de la Universidad Internacional de las Américas (UIA, donde se pesaron con humedad en beakers y luego del secado en la estufa con las condiciones especificadas, se estableció su peso, determinando por diferencia el peso total seco de membranas. En cuanto a los experimentos realizados para la hidrólisis enzimática, se puntualizan seguidamente:

Experimento 1

- 7 g de membrana en polvo en un beaker por triplicado (para las tres muestras).
- Se añadieron 42 mL de Buffer $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ para hidratar durante 30 minutos.
- La hidrólisis con pepsina preparada con 17.5 g en 280 mL de H_2O destilada ajustada a pH 3 con ácido fosfórico 1M, durante cinco horas a 40 °C.

Experimento 2

- 6 g de membrana en polvo en un beaker por triplicado (para las tres muestras).
- Se añadieron 36 mL de Buffer $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ para hidratar durante 30 minutos.
- La hidrólisis con pepsina 0.0240 g con 240 mL de H_2O HPLC ajustada a pH 3 con ácido fosfórico 1M, durante cinco horas a 40 °C.
- 1 mL de alcohol anhidro.

Preparación de reactivos buffer

Buffer $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$

Disolver 32 g de NH_4Cl en 300 mL de H_2O destilada, adicionando 30 mL de hidróxido de amonio concentrando y aforar con agua destilada a 500 mL.

Fase Móvil 0.05 M (Buffer de KH_2PO_4)

Pesar 6.8045 g de KH_2PO_4 y disolver con agua tridestilada, ajustando con pHmetro a pH 7 con NaOH 1M, proceder a filtrar con equipo de filtración al vacío para HPLC.

Materiales

- Beaker (600mL, 400mL, etc.)
- Espátula
- Micro espátula
- Piseta de H₂O destilada
- Piseta de acetona
- Goteros
- Agitadores de vidrio
- Termómetros
- Plantillas
- Pastillas agitadoras magnéticas
- Prensas universales
- Cinta
- Balones aforados (1000mL, 25mL, 10mL)
- Pipetas (5mL, graduadas)
- Peras
- Probetas (1000 mL, 25mL, 5mL, etc.)
- Papel filtro Qualitative P8
- Trompos de filtración de 0.20 μm

Reactivos

- NaOH 1M
- Ácido fosfórico 1M
- NH_4Cl
- Hidróxido de amonio

- Pepsina 2000 FIP
- Estándar ácido hialurónico
- Agua tridestilada
- Agua HPLC
- KH_2PO_4

3.5.1. 2 Limitaciones del estudio

En la Tabla 16 sobre el cronograma, descrita anteriormente según las fechas tentativas, estas no pudieron ser cumplidas al pie de la letra, debido a varias limitaciones que hicieron que los resultados se fueran postergando y alargando la investigación sin contemplación alguna. Por ejemplo, en las primeras semanas de inicio de la parte experimental el laboratorio no se contaba con un equipo para poder triturar las membranas secas y se optó por uno proveniente de fuera de las instalaciones.

El refrigerador no mantenía frescas las muestras porque no funcionaba bien; entonces se procedió a guardarlas en el congelador a una temperatura más baja. El estándar y la columna utilizada para la investigación, por cuestiones de la pandemia que están atravesando el país y el mundo entero, tuvieron un atraso más de lo esperado en aduanas para la obtención de ellas. El equipo de HPLC en último momento generó problemas antes de su utilización, lo que atrasó un poco más los resultados. Las bombas para el filtrado al vacío tenían un exceso de aceite en el motor, lo que hacía que se retornara esta abundancia hacia el matraz Kitasato, poniendo en riesgo las muestras.

3.5.2 Análisis de Datos

Se pretende hacer la extracción durante los meses de enero y febrero del 2022, con un período de duración de dos meses para recolectar los datos que llevarán a los resultados, y donde, con cada instrumento a utilizar en esta investigación se tome un tiempo máximo de un mes en completar cada objetivo específico planteado, en la Universidad Internacional

de las Américas. Cada instrumento permitirá identificar el procedimiento mediante hidrólisis enzimática con pepsina, de la extracción del ácido hialurónico a partir de las membranas testáceas presentes en las cáscaras de huevo, la evaluación cualitativa utilizando métodos fisicoquímicos e instrumentales, por último, la cuantificación lograda del extracto.

Para el análisis de los resultados futuros a obtener, con los instrumentos a utilizar en cada objetivo de la investigación, se planea inicialmente contar con el procedimiento de extracción, que se obtendrá de fuentes de información primarias y secundarias para un mejor entendimiento de los datos, que posteriormente serán sometidos a ser evaluados cualitativamente con equipos, como el espectro IR. Además, se hará la cuantificación del ácido hialurónico extraído, donde los resultados serán representados mediante diferentes gráficos, figuras, tablas, entre otros, para un mejor entendimiento, representación, relación entre las variables, categorías y los resultados alcanzados, además de observar los más relevantes para la investigación, y que puedan comprobar la teoría afirmada en otros estudios.

También, para la triangulación de los datos cualitativos y cuantitativos, se basa en que con lo obtenido del procedimiento, según las bases consultadas y las teóricamente esperadas, se aplicarán para posteriormente analizar esos resultados cualitativamente (describiendo los resultados e identificando con instrumentos), y cuantificando la cantidad de concentración del extracto de ácido hialurónico mediante el método cromatográfico de HPLC, realizando una curva de calibración con los patrones de la sustancia madre.

En la Tabla 9 se resumen las condiciones cromatográficas en las que se realizaron las muestras, patrones, blancos, para su posterior lectura y determinación de los análisis de resultados obtenidos, mediante el equipo Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (HPLC), marca YL, de la Universidad Internacional de las Américas. Para esto fue necesario basarse en el procedimiento de Ruckmani et al.⁶⁹, y que las condiciones se ven seguidamente:

Tabla 8. Condiciones de operación cromatográficas para el análisis de ácido hialurónico

Cromatógrafo	Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (HPLC)
Tipo de cromatografía	Cromatografía de exclusión molecular (SEC)
Columna	SEC-120 7.8x300mm
Temperatura de la columna	25 °C
Fase móvil	Tampón dihidrogenofosfato de potasio 0.05M pH 7
Flujo	1.0 mL/min
Volumen inyectado	10µL
Tiempo de retención esperado	5-6 min
Detector	UV
Longitud de onda	205 nm

Fuente: elaboración propia con base en la referencia⁶⁹.

CAPÍTULO IV- ANÁLISIS DE RESULTADOS

Seguidamente, en este apartado se presentan todos los resultados y análisis de la información recopilada, que ha sido producto de la ardua investigación ejecutada y de la realización experimental de aquellas variables planteadas a partir de los objetivos específicos delimitados, que son empleados en el presente Trabajo Final de Graduación. Resumidamente en este capítulo se detallará el procedimiento efectuado para la extracción del ácido hialurónico, su cualificación y cuantificación del extracto obtenido.

4.1 Realización de extracción del ácido hialurónico a partir de las membranas testáceas presentes en las cáscaras de huevo utilizando un método bioquímico.

Para determinar el procedimiento a seguir para la extracción del ácido hialurónico a partir de las membranas testáceas presentes en las cáscaras de huevo de gallina, se hizo una búsqueda exhaustiva, la que finalmente se basó en dos artículos científicos y una patente de la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (OMPI), sobre un método de obtención de un producto cicatrizante y obtenido de un hidrolizado de membrana. Luego de la revisión del material se desarrollaron los dos experimentos, que se expondrán en breve.

Primeramente, se obtuvieron de cuatro semanas para el experimento 1 (estos experimentos se detallarán más adelante) y luego para el experimento 2, se recolectaron durante dos semanas. Estas fueron sometidas a un secado por Estufa Digisystem a 40 °C durante cuatro horas para determinar sus pesos correspondientes, que en total se obtuvieron 40.7128 g. Seguidamente, se mostrará los pesos utilizados de membranas testáceas secas largamente:

Tabla 9. Pesos de membranas testáceas del experimento 1 en balanza analítica #13 ADAM Nimbus ± 0.0001 g

Muestras	1	2	3
Peso beaker (g) ± 0.0001 g	179.8115	178.9907	133.2800
Peso beaker +			

membrana húmeda (g) ± 0.0001 g	190.2888	190.0484	137.4434
Peso beaker + membrana seca (g) ± 0.0001 g	189.2822	188.9790	137.0480
Peso diferencia de pesos (g) ± 0.0001 g	9.4707	9.9883	3.7680
Total peso membranas secas: 23. 2270 g			

Fuente: elaboración propia.

Tabla 10. Pesos de membranas testáceas del experimento 2 en balanza analítica #13 ADAM Nimbus ± 0.0001 g

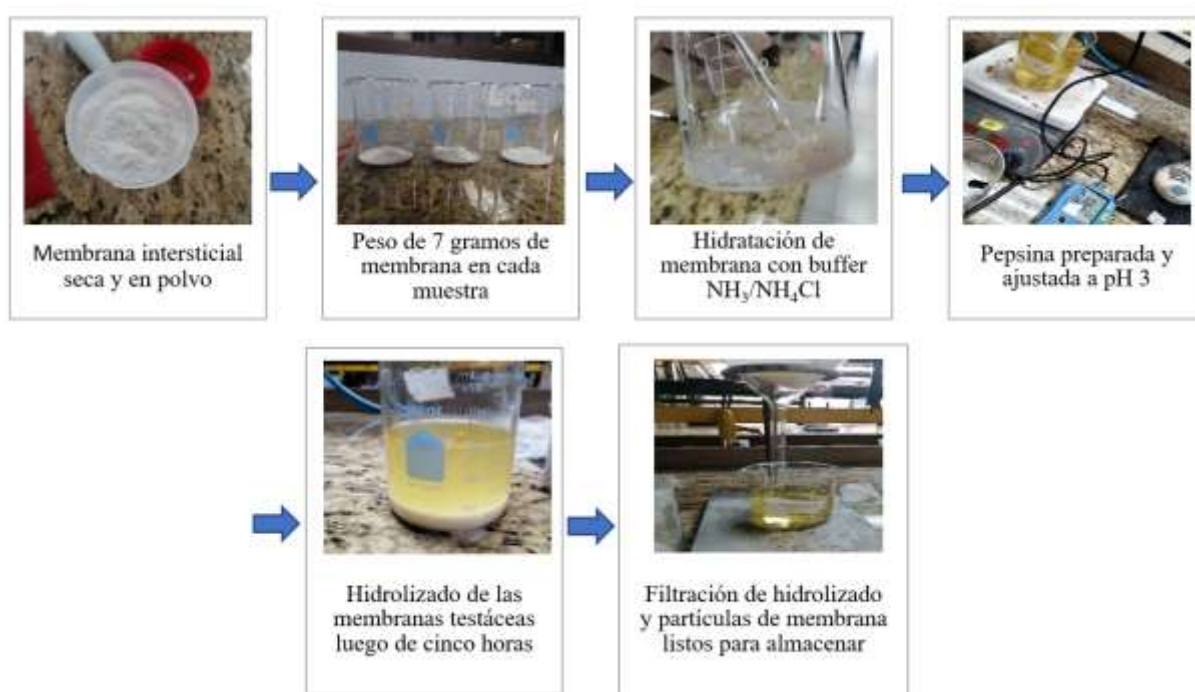
Muestras	1	2	3	4
Peso beaker (g) ± 0.0001 g	123.0514	131.8996	139.2387	179.6727
Peso beaker + membrana húmeda (g) ± 0.0001 g	128.1779	137.5081	144.2128	182.8452
Peso beaker + membrana seca (g) ± 0.0001 g	127.7969	137.0952	143.8254	182.6307
Peso diferencia de pesos (g) ± 0.0001 g	9.4707	9.9883	3.7680	3.1725
Total peso membranas secas: 17. 4858 g				

Fuente: elaboración propia.

4.1.1 Experimento 1

Este experimento se realizó con alrededor de unos 22 gramos de polvo de membrana seca, la cual fue pesada en beakers separados para hacerlo de manera triplicada y obtener mayor confiabilidad al obtener un promedio de las tres muestras. En el diagrama de flujo de la Figura 31 se puede visualizar, de forma resumida, el procedimiento para esta experimentación, donde los pasos serán descritos luego de la figura.

Figura 31. Procedimiento de extracción mediante hidrólisis enzimática con pepsina del experimento 1



Fuente: elaboración propia.

- Previamente secadas las membranas a 40 °C en la estufa y trituradas hasta polvo, se pesaron 7 gramos de estas por triplicado.
- Seguidamente, se añadieron por cada parte de membrana seis partes de líquido para hidratar estas, correspondiente a un buffer de $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ de pH 9.4. El volumen utilizado para los 7 gramos de cada muestra fue de 42 mL del buffer y se dejó hidratando 30 minutos.

- Mientras ocurría el tiempo de hidratación, se preparó por aparte la enzima, donde se tomaron para cada muestra 17.5 gramos de pepsina 2000 FIP-U/g, en 280 mL de agua destilada hasta disolver y ajustando su pH hasta 3.0 con ácido fosfórico 1M.
- Para la hidrólisis enzimática con pepsina, se procedió a mezclar la membrana hidratada y la disolución con la enzima, en condiciones de 40 °C durante cinco horas.
- En cuanto a la inactivación de la enzima, se subió la temperatura de las muestras hasta 60°C durante 15 minutos para la desnaturalización.
- Posteriormente, se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y depurar mediante papel filtro Qualitative P8, para envasar y almacenar en refrigeración todas las muestras.

La decisión de optar por modificar el pH de las muestras, después de hidratar a las membranas, es debido a que se sabe que las dos variables a controlar en las enzimas son el pH y la temperatura; cada enzima tiene una temperatura específica para actuar, y si es mayor o menor a esta, la velocidad de reacción enzimática se enlentece y ocurre la inactivación⁷⁰. Es por esto por lo que la temperatura se subió, por encima de la cual la pepsina hacía su función. Las muestras fueron ajustadas a pH 3 para agregarles la enzima, ya que es el pH óptimo para realizar el ataque enzimático además de una temperatura de 40 °C⁶⁵.

4.1.2 Experimento 2

Este experimento se ejecutó debido a que la consistencia, el olor y color resultante de las muestras no eran de gran apariencia, posiblemente por la pepsina que se degrada con facilidad y estaba presente en gran cantidad. Además, a los días de tener las mismas en refrigeración, mas no en congelación, empezó a darse un crecimiento microbiano en estas, donde el agua y la pepsina ayudaron a propiciar el ambiente. Por lo tanto, con alrededor de unos 20 gramos de polvo de membrana seca, la cual fue pesada en beakers separados para hacerlo de manera triplicada y obtener mayor confiabilidad al obtener un promedio de las

tres muestras, se realizó esta experimentación en condiciones diferentes a la del procedimiento 1.

En el diagrama de flujo de la figura 32 se puede visualizar de forma resumida el procedimiento para esta experimentación, donde los pasos serán descritos posteriormente de la siguiente figura.

Figura 32. Procedimiento de extracción mediante hidrólisis enzimática con pepsina del experimento 2



Fuente: elaboración propia.

- Previamente secadas las membranas a 40 °C en la estufa y trituradas hasta polvo, se pesaron 6 gramos de estas por triplicado.
- Seguidamente, se añadieron por cada parte de membrana seis partes de líquido para hidratar estas, correspondiente a un buffer de $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ de pH

9.4. El volumen utilizado para los 6 gramos de cada muestra fue de 36 mL del buffer y se dejó hidratando 30 minutos.

- Luego de transcurrido el tiempo de hidratación, se agregó la enzima, donde se tomaron para cada muestra 0.0240 gramos de pepsina 2000 FIP-U/g, adicionando 240 mL de agua para HPLC hasta disolver y ajustando su pH hasta 3.0 con ácido fosfórico 1M.
- Para la hidrólisis enzimática con pepsina, se procedió a mezclar la membrana hidratada y la disolución con la enzima, en condiciones de 40 °C durante cinco horas.
- En cuanto a la inactivación de la enzima, se subió la temperatura de las tres muestras hasta 60°C durante 15 minutos, para la desnaturalización.
- Posteriormente se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y depurar mediante papel filtro Qualitative P8, para envasar y almacenar en refrigeración todas las muestras.

El cambio de 17.5 gramos de pepsina a 0.0240 g en cada muestra ocurrió debido a que inicialmente, según Üргеová et al.⁶⁵, el valor de pepsina a utilizar en las condiciones especificadas de pH 3 y a 40°C era de 80 FIP-U/g DM y, debido a que en el laboratorio de la UIA solo se contaba con pepsina 2000 FIP, se hizo el reajuste de las cantidades, dando una proporción de 0.0040 gramos por cada 100 mg de membrana; esto equivale a que, como se utilizaron 6 gramos de membrana intersticial, el total a utilizar fueron 24 mg de pepsina en cada muestra para su hidrólisis enzimática.

Tanto en la Figura 31 como en la Figura 32 se muestran los cambios notables en los resultados en los experimentos 1 y 2, respectivamente. En la experimentación 1 se observa un hidrolizado de color amarillo-verdoso como el de la pepsina preparada, mientras que en el experimento 2 se ve un color ya más agradable visualmente y el olor es más atractivo, en comparación con el primero. Otra diferencia entre ambos es que a las muestras de la experimentación 2 se les añadió 1 mL de alcohol anhidro y se almacenaron en envases de color ámbar, en refrigeración todo el tiempo.

Al cabo de unos cuantos días, en las muestras de experimento 2 se notaron varios cambios en cuanto a los aspectos físicos de las mismas, los cuales se explicarán con más detalle en la siguiente sección de la evaluación cualitativa del extracto hidrolizado de las membranas testáceas de las cáscaras de huevo. Además, en la Tabla 11 se muestra el resumen de las condiciones para el procedimiento de extracción.

Este trabajo de investigación se basó en el método de hidrólisis enzimática mediante pepsin; sin embargo, existen otros métodos para poder realizar la extracción del polisacárido (ácido hialurónico). Esta técnica de hidrólisis enzimática se utilizó, ya que, según estudios, con la hidrólisis química las sales interaccionan directamente con la molécula de ácido hialurónico y se consigue un menor rendimiento, mientras que con la enzimática las enzimas van a interaccionar con las proteínas presentes, y esto contribuye a alcanzar mayor rendimiento⁴⁶.

Además, otra razón por la cual se prefiere la técnica de hidrólisis enzimática con respecto a la hidrólisis química, que como bien se sabe, esta última puede ser de carácter básico o ácido. Este tipo de hidrólisis tiene la desventaja de destruir ciertos componentes de utilidad y reducir el valor nutricional de ciertas proteínas. En cambio, con la técnica de hidrólisis de tipo enzimática tiene un efecto positivo en comparación con las otras, debido a que tiene la virtud de utilizar condiciones leves que ayudan a conseguir un producto con características nutricionales favorables y posibles bioactividades⁴¹.

Ahora bien, para escoger la enzima adecuada para utilizar en el proceso de hidrólisis enzimática, cabe resaltar que en el laboratorio de la Universidad Internacional de las Américas se contaba con la pepsina que, aunque se valoró utilizar otra enzima proteolítica no se contaba con la posibilidad, así que se descartó esta opción. Se encontró una patente de la Oficina Española de Patentes y Marcas acerca de un procedimiento de hidrolización de membranas de cáscara de huevo con diferentes técnicas, utilizando una proteasa, un agente reductor, un agente desnaturizante y un tampón⁴¹.

Dentro de los agentes desnaturizantes que pueden valorarse a utilizar está el laurilsulfato de sodio (SDS) o taurocolato de sodio. Los agentes reductores podrían ser por hidroximetanosulfinato de sodio ($\text{HOCH}_2\text{SO}_2\text{Na}$), metabisulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) y

ditiotreitól (DTT), preferiblemente metabisulfito de sodio y DTT, siendo el mejor metabisulfito de sodio A causa de los resultados que se obtuvieron en ese estudio, se dice que con papaína se puede lograr un 100% de solubilización de proteínas utilizando DTT como reductor y SDS como agente desnaturizante, en un tiempo de una hora⁴¹.

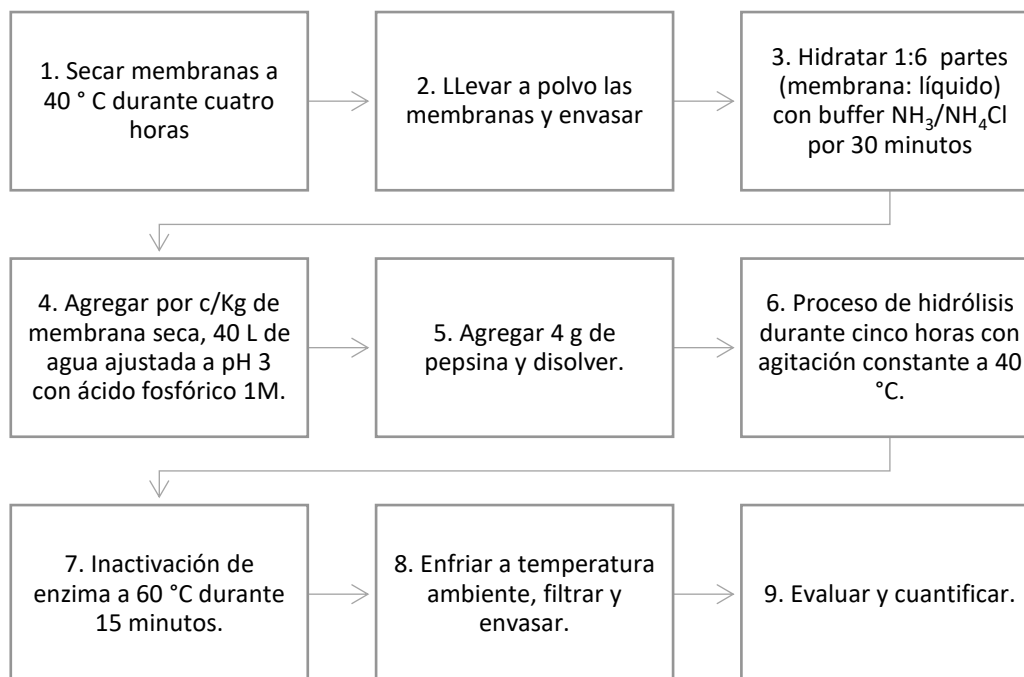
Asimismo, se ha estudiado que cuando existen proteínas que son difíciles de hidrolizar, se pueden combinar varias proteasas para una hidrolización enzimática más efectiva; sin embargo, utilizar la mezcla de varias enzimas de este tipo podría aumentar el coste de esta técnica. Es por esto por lo que sería codiciado alcanzar un procedimiento, en el que se pueda conseguir una eficacia en cuanto a la solubilización de membrana conveniente con solamente una proteasa y que, de esta manera, se puedan analizar los componentes conservando una alta integridad de las proteínas⁴¹.

Tabla 11. Resumen de condiciones de hidrólisis enzimática con pepsina

Dosis de enzima	2000 FIP/ 4mg membrana seca
Cantidad de buffer añadido para hidratación	6 mL/ 1g membrana seca
Cantidad de agua añadida para hidrólisis	40 mL/ 1 g membrana seca
pH del buffer	9.4
pH de hidrólisis	3.0
Tiempo de hidratación	30 min
Temperatura de tratamiento	40°C
Tiempo de hidrólisis	5 h
Temperatura de inactivación	60°C
Tiempo de inactivación	15 min
Tipo de separación de hidrolizado y membranas	Filtrado

Fuente: elaboración propia.

Figura 33. Propuesta final del proceso de extracción por kilogramo de membranas testáceas secas



Fuente: elaboración propia.

Siempre, luego de una extracción, es importante realizar una purificación de lo obtenido; es por esto por lo que, además de la importancia de purificar, debido a que el ácido hialurónico se encuentra incorporado a diferentes polímeros en el tejido conectivo, este debe ser refinado a través de diferentes técnicas, tales como: digestión con proteasas, precipitación con/sin solventes, ultrafiltración y/o liofilización⁷¹.


Según muchos datos propuestos, una forma de purificar el extracto es mediante fermentación bacteriana para conseguir un biopolímero viable. Sin embargo, por lo general cuando se utilizan bacterias se podría reducir su peso molecular del AH, y la idea es alcanzar un peso molecular elevado. Asimismo, en la invención de Santosh et al.⁷² proponen un método optimizado para purificar el AH mediante la filtración en gel de sílice compuesta, con un tratamiento con carbón activo y luego una diafiltración utilizando menos disolvente, todo esto libre de agentes tensioactivos o detergentes⁷².

4.2 Evaluación cualitativamente el ácido hialurónico extraído a partir de las membranas testáceas presentes en las cáscaras de huevo utilizando métodos fisicoquímicos e instrumentales.

Para evaluar cualitativamente los extractos hidrolizados del ácido hialurónico, hay que basarse en dos valoraciones, una en la descripción de las apariencias de estos (ver Tablas 12 y 13) y otra donde se comparó mediante espectros IR el estándar de ácido hialurónico versus cada una de las muestras realizadas en los dos momentos que se analizaron las muestras a lo largo de este proyecto de investigación, lo que se puntualizará seguidamente.

Es importante mencionar que las muestras realizadas en el experimento 1 llegaron hasta el punto de análisis de la evaluación cualitativa en la descripción de la apariencia física, debido al problema de la aparición de contaminación. Por otro lado, en las muestras del experimento 2, sí siguieron hasta el final del análisis de este trabajo, aunque se tuvo que filtrar varias veces para mantenerse. (Ver Figuras 33 y 34).

Tabla 12. Descripción de apariencia física de la muestra representativa del hidrolizado de membrana después de la filtración del experimento 1

Imagen	Descripción
	<p>El aspecto de las muestras del experimento 1 luego de la filtración se puede mostrar en esta imagen, posee un color bastante particular de amarillo-verdoso y con olor peculiar muy parecido a la pepsina, se puede relacionar por la gran cantidad de enzima que se utilizó.</p>


Fuente: elaboración propia.

Tabla 13. Descripción de apariencia física de la muestra representativa del hidrolizado de membrana a varios días después de la extracción del experimento 1

Imágenes	Descripción
	<p>A lo que respecta acerca de estas muestras del experimento 1, donde se almacenaron por varios días luego de su extracción y filtración, estas presentaron un precipitado donde pareciera que se formaron dos fases. Su aspecto físico era bastante notable, con un color muy parecido a las muestras recientes, pero con una apariencia más turbia y un olor como a fermentación.</p> <p>Se puede notar cómo al principio se contaminó y luego el crecimiento microbiano aumentó bastante después de varios días a partir de que la muestra se almacenó.</p> <p>Estas características tan peculiares pueden ser causadas por varios factores como: la misma pepsina que se degrada tan fácil y estaba presente en bastante cantidad, el ambiente adecuado propiciado por el agua y la temperatura para que proliferara el hongo, ya que siempre estuvo en refrigeración, sin embargo, nunca en congelación. Y la temperatura del refrigerador del laboratorio era de alrededor de 20°C. Es por esto por lo que se descartaron estas muestras para analizarlas.</p>

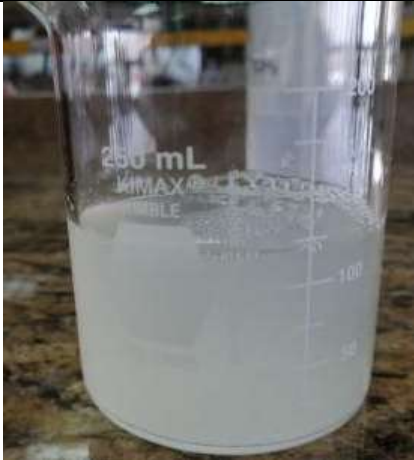
Fuente: elaboración propia.

Tabla 14. Descripción de apariencia física de la muestra representativa del hidrolizado de membrana a los pocos días de la extracción del experimento 2

Imagen	Descripción
	<p>En las muestras del experimento 2 recién filtradas después de la hidrólisis enzimática, se notó un aspecto de color blanquecino y un poco turbio; su olor ya no era tan característico como el del experimento 1, que puede deberse a que se utilizó menor cantidad de enzima y con otras condiciones especificadas en la sección anterior donde se explica detalladamente el procedimiento. Además, para que el crecimiento microbiano no afectara a las muestras, se les agregó 1 mL de alcohol anhidro.</p>

Fuente: elaboración propia.

Tabla 15. Descripción de apariencia física de la muestra representativa del hidrolizado de membrana a varios días después de la extracción del experimento 2.

Imágenes	Descripción
	<p>Luego de varios días después de la extracción de las muestras en el experimento 2, se nota que se genera un poco de cambio en la turbidez de los ejemplares, además de la aparición de ciertas generaciones características de los polisacáridos. El olor también fue otro punto característico a notar, ya que se notó un cambio a uno más dulce; sin embargo no era desagradable. Por lo tanto, se procedió a filtrar una vez más.</p>



Fuente: elaboración propia.

Figura 34. Filtración de las muestras del experimento 2 al cabo de varios días mediante jeringas y trompos de filtro 0.20 μm



Fuente: elaboración propia.

Figura 35. Filtración de las muestras del experimento 2 al cabo de varios días mediante filtración al vacío



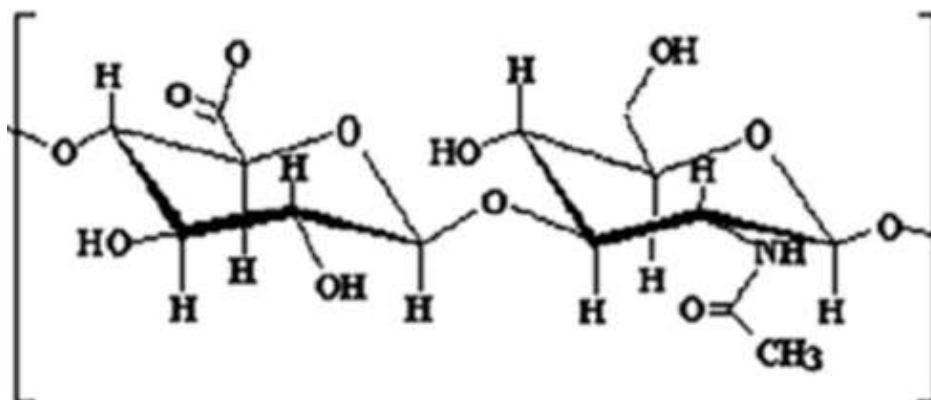
Fuente: elaboración propia.

A lo que concierne al análisis de identificación de las muestras del experimento 2 que fueron las que siguieron en pie para la investigación, mediante espectroscopia infrarroja (IR), cabe resaltar que no se profundiza el estudio de todos los picos del espectro, sino simplemente la relación obtenida a nivel macro del estándar de ácido hialurónico, en comparación con cada una de las muestras realizadas que se expondrán más adelante, ya que el objetivo es identificar con la comparación, no individualizar el estudio.

Primeramente, la importancia de esta espectroscopia vibracional de absorción IR implica que se puede identificar el compuesto a analizar, y a la vez estudiar la estructura de un ejemplar. Este ofrece, además, información valiosa sobre los grupos funcionales de moléculas de una estructura incógnita. Para el análisis se utilizan bases de datos, que contienen un estándar y se pueden ver las similitudes con las diferentes pruebas. Para lo que es la lectura, el eje de las X pertenece a la longitud de onda, y el eje de las Y corresponde a las bandas de absorbancia o transmitancia⁷³.

En la Figura 36 aparece una imagen de la estructura del ácido hialurónico, que será estudiada con respecto a las muestras y el estándar a continuación. Es importante volver a recordar en esta parte la molécula y la estructura del ácido hialurónico para ver sus grupos funcionales y por lo tanto, funcionará en la parte de identificación en la espectroscopia infrarroja utilizada para este análisis⁷⁴.

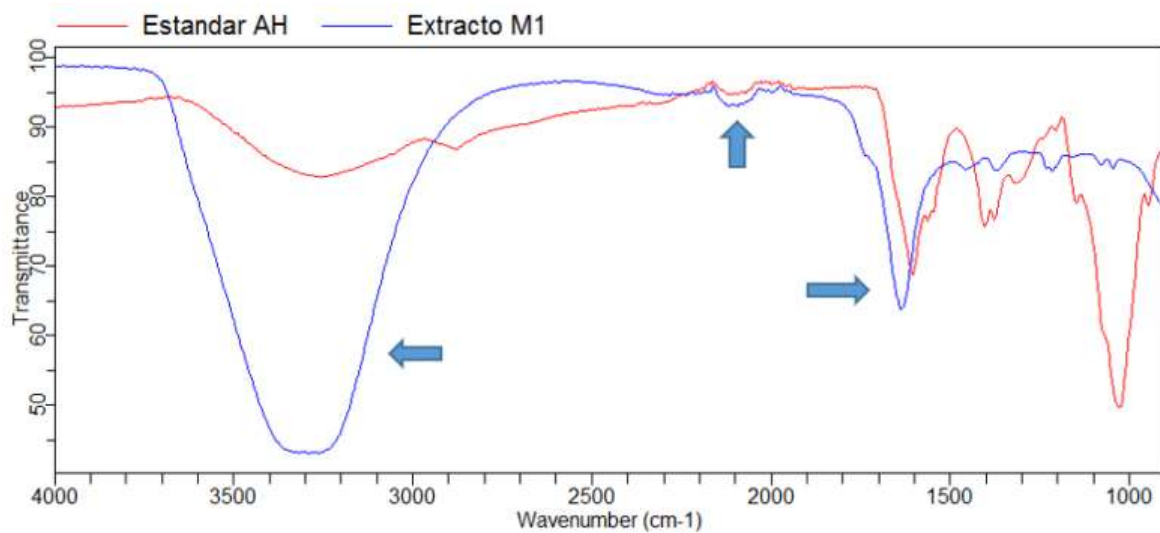
Figura 36. Estructura del ácido hialurónico



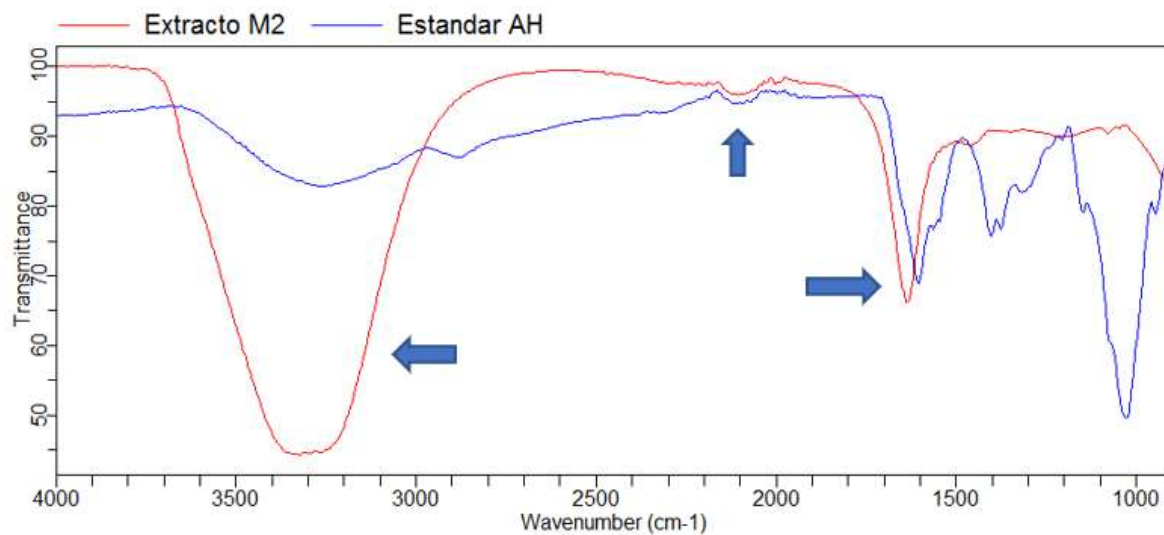
Fuente: Manju et al.⁷⁴

Como se muestra en las Figuras de la 37 a la 40, se puede observar que la muestra del extracto 1 posee gran cantidad de agua con respecto a la del estándar que, aunque se ve la señal por posible humedad, no es tan pronunciada como la de la muestra. Las bandas que aparecen entre los 3500 y 3200 cm^{-1} corresponde al enlace O-H presente en el agua, ya que esta provoca una banda muy amplia y alta⁷⁵.

Además, se pueden observar dos señales importantes muy similares a las del espectro del estándar, las cuales se ubican cerca de los 2100 cm^{-1} y la otra en los 1600 y 1700 cm^{-1} ; esta última tiene mayor relevancia al absorber más, y corresponde a la banda relacionada con los enlaces C=O, C=C y C=N⁷⁵; esta señal es intensa y se relaciona mucho con las muestras y el estándar, tal como se puede prestar atención en las Figuras de la 37 a la 40, donde se ejemplifican estas bandas.

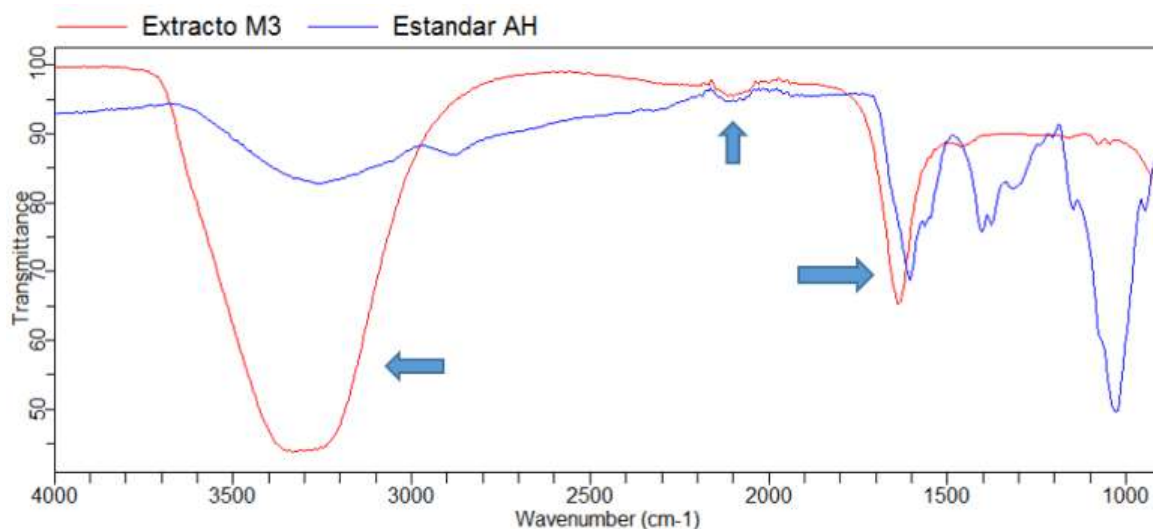
Figura 37. Comparación de la muestra 1 con respecto al estándar de AH

Fuente: elaboración propia.

Figura 38. Comparación de la muestra 2 con respecto al estándar de AH

Fuente: elaboración propia.

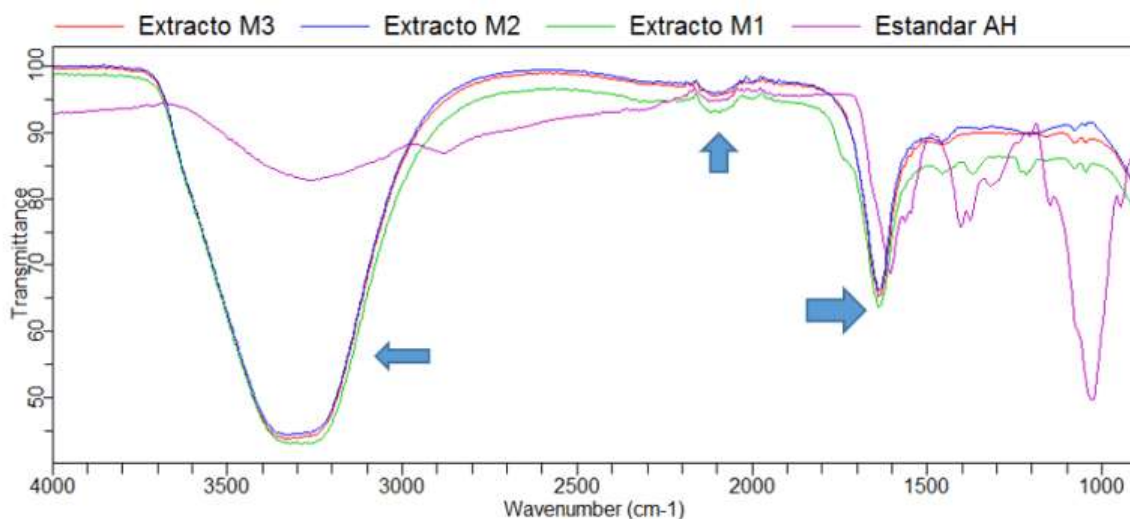
Figura 39. Comparación de la muestra 3 con respecto al estándar de AH



Fuente: elaboración propia.

Por otro lado, la banda de 2100 cm^{-1} , que comúnmente en esta región en los espectros no suelen apreciarse señales, y si aparecieran estas bandas poseen una forma muy débil, y ordinariamente no son de importancia para el análisis de la interpretación de un espectro⁷⁶, es por esto por lo que este trabajo de investigación hace énfasis en otras bandas del espectro como lo es la señal de $1600\text{ y }1700\text{ cm}^{-1}$. Como se puede ver en la figura 41.

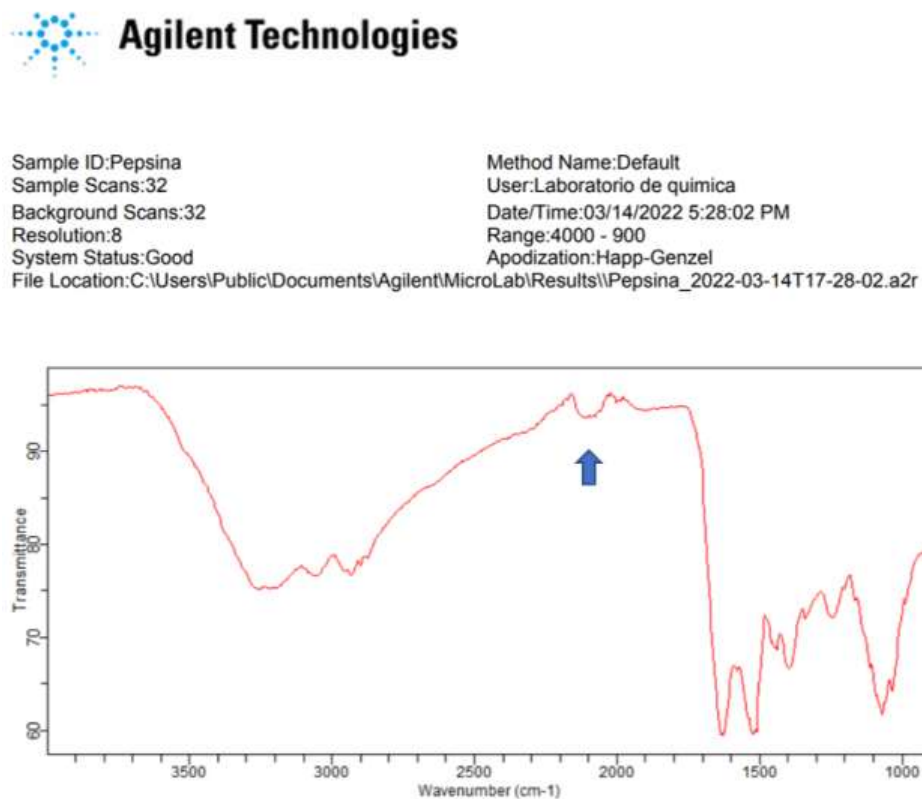
Figura 40. Comparación de las muestras 1, 2 y 3 con respecto al estándar de AH



también el espectro de la pepsina posee este pico en ese rango de los 2100 cm^{-1} .

Fuente: elaboración propia.

Figura 41. Espectroscopia IR de la pepsina



Fuente: elaboración propia.

4.3. Cuantificación del ácido hialurónico extraído a partir de las membranas testáceas presentes en las cáscaras de huevo.

En esta sección se presentarán los resultados de las muestras del hidrolizado para la extracción del ácido hialurónico. Estos se basan resumidamente en la determinación de la densidad, la medición del pH en las muestras, y por último la concentración del ácido hialurónico que hay en cada muestra, mediante el análisis por el Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (HPLC).

A lo que corresponde a la densidad, se utilizó el método de medición por picnómetro donde se obtienen los siguientes resultados:

Tabla 16. Datos para los cálculos de densidad del hidrolizado.

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Agua destilada
Peso picnómetro vacío (g) ±0.0001 g	23.9567	23.9567	23.9567	23.9567
Peso picnómetro + muestra (g) ±0.0001 g	48.9815	48.9890	49.0176	48.8589
Peso de muestra (g) ±0.0001 g	25.0248	25.0323	25.0609	24.9022
Volumen del picnómetro (mL)	25.015	25.015	25.015	25.015
Densidad (g/mL)	1.0049	1.0052	1.0064	1.0000

Fuente: elaboración propia.

Para efectos de los cálculos de la densidad, fue basada en la teoría de Atarés⁵⁰; además se realizará una muestra de cálculos para M1:

$$Densidad = \frac{m_{p+d} - m_p}{m_{p+w} - m_p} \cdot \rho_w$$

Donde:

m_{p+w} : picnómetro+ agua

m_{p+d} : picnómetro+ muestra

m_p : picnómetro vacío

ρ_w : densidad del agua

$$Densidad M_1 = \frac{48.9815 \text{ g} - 23.0567 \text{ g}}{48.8589 - 23.0567 \text{ g}} \cdot 1.0000 \text{ g/mL}$$

$$\text{Densidad} = 1.0049 \text{ g/mL}$$

Para la medición del pH de las muestras se utilizó el pHmetro del laboratorio de la Universidad Internacional de las Américas, donde existió una reproducibilidad bastante buena ya que el valor de cada muestra del hidrolizado de membrana intersticial fue de 4.9, tal como se puede observar en la Figura 42 del presente proyecto de investigación.

Figura 42. Resultado representativo del pH de las muestras del hidrolizado



Fuente: elaboración propia

El método de análisis para las muestras con respecto al estándar de ácido hialurónico fue obtenido de Ruckmani et al.⁶⁹, donde esta técnica fue validada para incluir las demandas esenciales de la Conferencia Internacional sobre las directrices de Armonización (ICH) con parámetros como especificidad, linealidad, exactitud, precisión, rango, robustez.

Para poder cuantificar la concentración de ácido hialurónico, se determinó una curva de calibración con el estándar de este compuesto, con unas concentraciones de 100, 200 y 400 ppm (mg/L), después de esto, con el equipo Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (HPLC) y las condiciones pertinentes (Ver Tabla 8). En la tabla 17 se

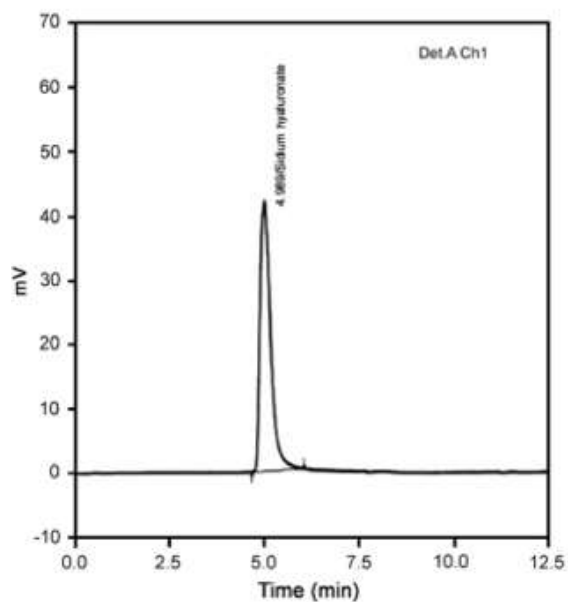
mencionan las condiciones experimentales y la secuencia de análisis. Se pudieron obtener los tiempos de retención y las áreas respectivas tanto de los patrones como de las muestras, para con esto conseguir la recta y determinar las concentraciones en unidades de partes por millón en cada muestra del hidrolizado de membrana de cáscaras de huevo de gallina.

En el sistema cromatográfico se utilizó una fase móvil de 0.01M de KH_2PO_4 ajustado el pH a 7 con NaOH 1M y en las condiciones establecidas en la Tabla 8. En la Figura 42 se puede ver que el tiempo de retención esperado para el estándar y las muestras es de aproximadamente 5 minutos. Sin embargo, en el tiempo de retención del estándar utilizado tal como se observa en la Figura 43, el tiempo fue entre los 6 y 7 minutos, y es por esto por lo que los resultados se enfocarán con respecto a estos tiempos, porque el objetivo es comparar con el pico característico del estándar y muestras (ver figura 44), no profundizar en cada uno de ellos.

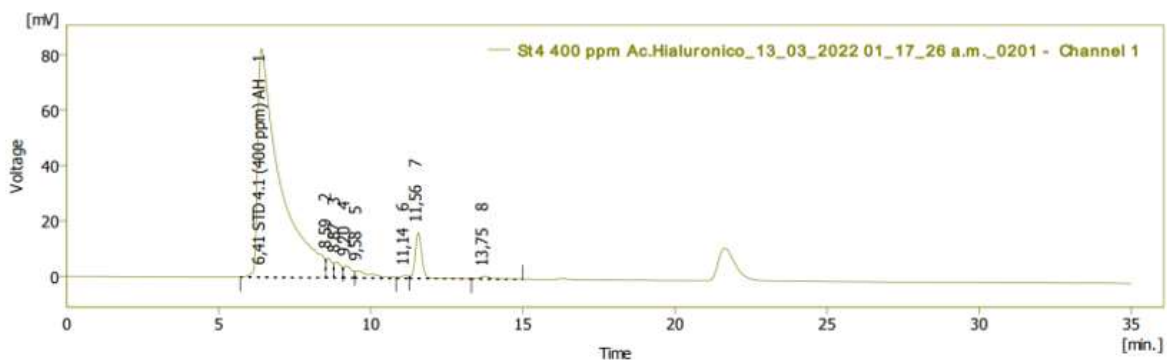
Tabla 17. Condiciones experimentales y secuencia de análisis

Sustancia	Inyecciones
Blanco	2
Blanco de Fase Móvil	2
Estándar 50 ppm	5
Estándar 100 ppm	5
Estándar 200 ppm	5
Estándar 400 ppm	5
Muestra 1	3
Muestra 2	3
Muestra 3	3

Fuente: elaboración propia.

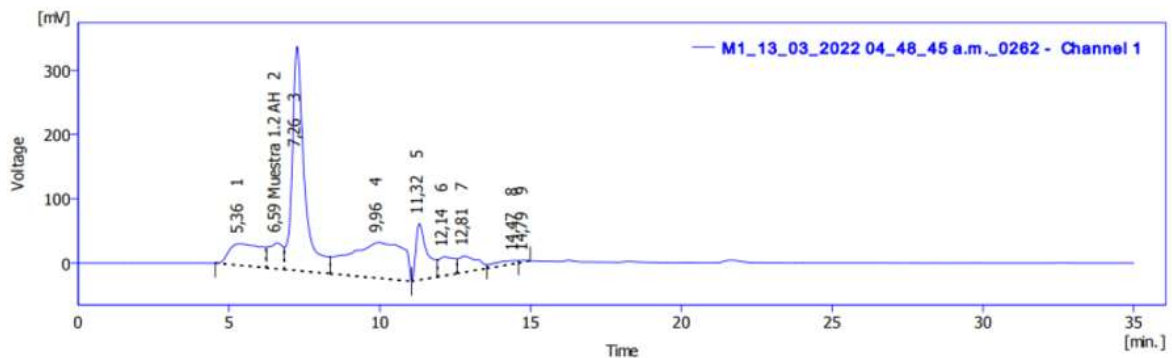
Figura 43. Cromatograma típico por HPLC del ácido hialurónico

Fuente: Ruckmani et al.⁶⁹

Figura 44. Cromatograma HPLC del ácido hialurónico experimental

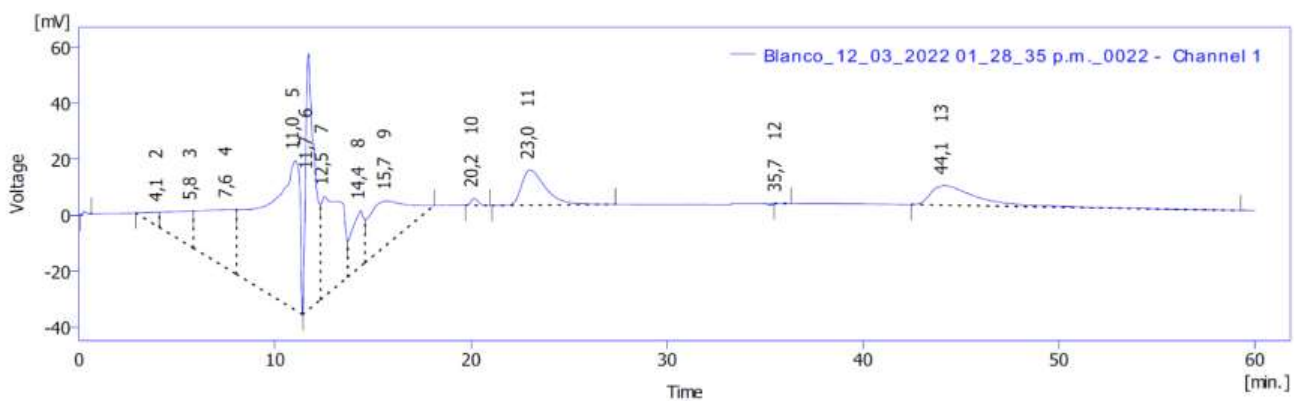
Fuente: elaboración propia.

Figura 45. Cromatograma HPLC representativo de las muestras



Fuente: elaboración propia.

Figura 46. Cromatograma HPLC del Blanco



Fuente: elaboración propia.

Es importante recalcar que en el blanco no se obtuvo el pico característico del ácido hialurónico, ya que en los 6-7 minutos no se pudo presenciar ningún pico, lo que da una buena señal en la separación de los compuestos. Además, existen otros picos en los cromatogramas de las muestras, debido a que hay otros componentes en estas, pero que no

son relevantes para esta investigación, por eso solo se enfoca en el pico particular del estándar.

En los resultados de los tiempos de retención de las muestras del hidrolizado, y tanto la solución madre como los patrones se muestran en la Tabla 19, donde se pueden observar también los promedios respectivos que se obtuvieron por cada uno, según las inyecciones programadas en el equipo (ver Tabla 18) ; mientras que en la Tabla 20 se detallan las áreas en los tiempos de 6 y 7 minutos.

Tabla 18. Tiempos de retención de los patrones de AH a diferentes concentraciones y de las muestras de hidrolizado

	Tiempo 1 (min)	Tiempo 2 (min)	Tiempo 3 (min)	Tiempo 4 (min)	Tiempo 5 (min)
Patrón 50 ppm	6,490	6,870	6,653	6,540	6,470
Patrón 100 ppm	6,453	6,447	6,443	6,440	6,420
Patrón 200 ppm	6,420	6,413	6,410	6,417	6,413
Patrón 400 ppm	6,410	6,403	6,393	6,403	6,400
Muestra 1	6,610	6,593	6,577	NA	NA
Muestra 2	6,593	6,587	6,583	NA	NA
Muestra 3	6,587	6,570	6,587	NA	NA

Fuente: elaboración propia.

Tabla 19. Resultados de las réplicas de las áreas de los patrones de AH a diferentes concentraciones y de las muestras de hidrolizado el tiempo de retención de entre 6 y 7 minutos

	Área 1 (mV.s)	Área 2 (mV.s)	Área 3 (mV.s)	Área 4 (mV.s)	Área 5 (mV.s)	Área \bar{X} (mV.s)
Patrón 50 ppm	346,945	4770,465	4734,118	4688,285	4690,934	3846,149
Patrón 100	3962,548	1018,590	1240,456	1035,336	1310,320	1713,450

ppm							
Patrón 200 ppm	1752,520	2230,654	2339,712	2343,970	2390,529	2211,477	
Patrón 400 ppm	4227,110	3753.513	3694.130	3732.896	3680.812	3808,692	
Muestra 1	1110,239	1301,706	1299,378	NA	NA	1237,108	
Muestra 2	750,475	714,404	716,557	NA	NA	727,145	
Muestra 3	830,262	796,659	813,274	NA	NA	813, 398	

Fuente: elaboración propia.

Para efectos de cálculo para la ecuación de la recta en cuanto a la concentración de AH presente en las muestras, no se tomaron todos los datos, se descartaron los resultados del patrón de 50 ppm. Además, para los patrones de 100, 200 y 400 ppm se usó el promedio de las tres áreas mejores, siendo así que se representa de la siguiente manera para la curva de calibración:

Tabla 20. Datos utilizados para la curva de calibración

X (Concentración (ppm))	Y (Área \bar{X} (mV.s))	Áreas utilizadas
100	1098.127	2, 3 y 4
200	2107.629	1, 2 y 3
400	3904.506	1, 2 y 4

Fuente: elaboración propia.

Cálculos respectivos de la determinación de concentraciones de Ácido Hialurónico por HPLC

Cálculo de la disolución madre de Ácido Hialurónico

$$\text{Solución madre} = \frac{10 \text{ mg}}{25 \text{ mL}} = 400 \text{ ppm}$$

Cálculo de Ácido Hialurónico en las muestras del hidrolizado de membrana

Determinación de AH en la Muestra 1:

$$y = 9.3017x + 199.69$$

$$x = (y - 199.69) / 9.3017$$

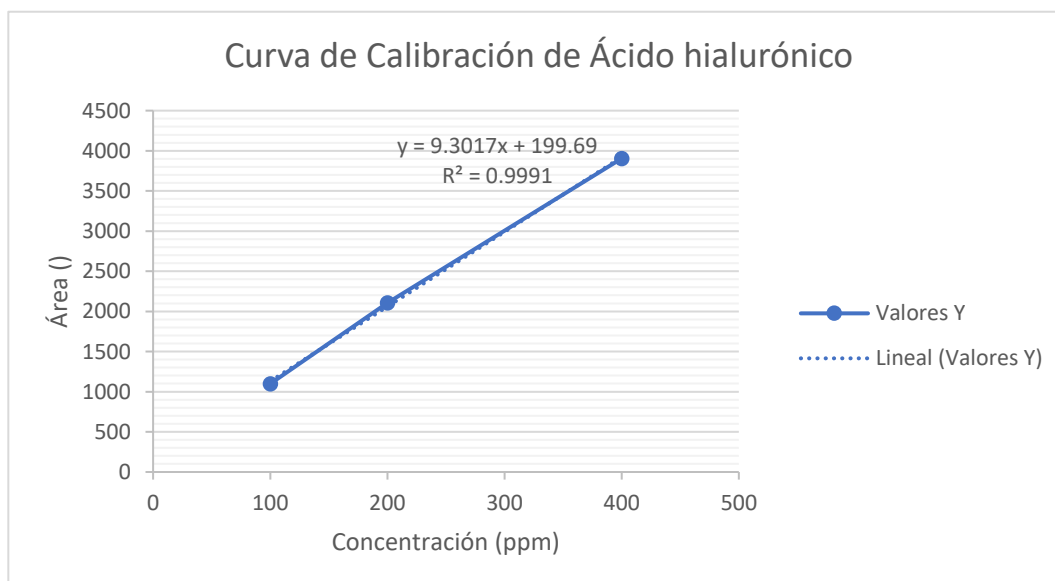
$$x = (1237.108 - 199.69) / 9.3017$$

$$x = 111.5299 \text{ ppm}$$

Concentración* Factor de dilución $\left(\frac{\text{Balón}}{\text{Pipeta}}\right)$

$$111.5299 \text{ ppm} * \left(\frac{10 \text{ mL}}{5 \text{ mL}}\right) = 203.0598 \text{ ppm}$$

Figura 47. Curva de calibración de Ácido Hialurónico



Fuente: elaboración propia.

Finalmente, como se puede mostrar en la Tabla 22, donde aparecen las concentraciones de AH en las muestras de la extracción, existen mucha variabilidad en los resultados con una DSR de 31.66%. (Ver Tabla 23). Sin embargo, la curva de calibración posee un buen coeficiente de correlación entre los patrones. Por otro lado, la muestra con

mayor porcentaje de rendimiento fue la muestra 1, siendo el valor teórico el de la solución madre del estándar (400ppm).

Tabla 21. Resultados de las concentraciones y cantidades aproximadas de AH en las muestras de hidrólisis de membrana.

Muestras	Concentración ppm (mg/L)	Volumen final (L)	Cantidad (mg)
1	203.0598	0.170	34.52
2	113.4104	0.174	19.73
3	131.9560	0.153	20.20

Fuente: elaboración propia.

Tabla 22. Cálculos estadísticos para las muestras.

Medidas de dispersión	Valores
Promedio (\bar{X})	24.82 mg
Varianza (S^2)	70.6712
Desviación Estándar (DR)	8.4066
Desviación estándar Relativa (DSR)	33.87%

Fuente: elaboración propia

Con estos resultados estadísticos se indica que existe una dispersión en los datos de las muestras, aunque el DSR no sea elevado. Además, el porcentaje de rendimiento no pudo ser calculado con respecto a las cáscaras de huevo de gallina, ya que estas se obtuvieron como material de desecho de una panadería, no se pudieron valorar en peso las cáscaras ni cuántos huevos en total, y todo fue basado en el peso de las membranas testáceas secas.

**CAPÍTULO V- CONCLUSIONES Y
RECOMENDACIONES**

5.1 Conclusiones

- El método enzimático utilizado para la extracción del ácido hialurónico fue satisfactorio puesto que se pudieron identificar y cuantificar cantidades de este compuesto comparado con el estándar de este.
- El procedimiento realizado para la extracción del ácido hialurónico a partir de las membranas testáceas presentes en las cáscaras de huevo, mediante hidrólisis enzimática con pepsina, fue efectivo. Sin embargo, se puede mejorar y hacer escalamientos utilizando otras técnicas, con la realización de hidrólisis de otro tipo que no sea enzimática, para lograr solubilizar mejor las proteínas presentes en la membrana y obtener resultados de solubilización mejorados.
- Se pueden utilizar incluso otros tipos de enzimas y agentes para ayudar a realizar una mejor extracción del componente de interés, en este caso el ácido hialurónico, esto con las respectivas condiciones óptimas del caso.
- En la evaluación cualitativa del extracto alcanzado de las membranas intersticiales de las cáscaras de huevo, se puede concluir que existen características en las apariencias de los experimentos no tan agradables; por ejemplo, el olor.
- Además, con el equipo de espectrofotometría infrarroja se pudieron comparar las muestras con el estándar, y observar ciertas similitudes en las bandas del espectro de ambos; la más característica es la cercana a 1600cm^{-1} , y comprobar que las muestras poseen gran cantidad de agua.
- Para la cuantificación del extracto obtenido de ácido hialurónico, todas las evaluaciones de densidad, pH y concentración de las muestras fueron satisfactorias. El método de análisis por el Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (HPLC) arrojó resultados de suma relevancia para esta investigación, logrando con ello definir que en las muestras 1, 2 y 3 existe una concentración de ácido hialurónico de 203.0598 ppm, 113.4104 ppm y 131.9560 ppm, respectivamente. Esto significa que las muestras pueden contener alrededor de 19.73mg, 20.20 mg y 34.52 mg de AH.
- El porcentaje de rendimiento con respecto a las cáscaras de huevo de gallina no se pudo obtener, debido a que al ser estas obtenidas como material de desecho de una

panadería, no se pudo detallar en peso, y todo fue basado en las membranas testáceas secas.

- Con los espectros por HPLC de tipo SEC, se pudo evidenciar la existencia del ácido hialurónico en las muestras, lo que indica que la reacción por hidrólisis enzimática con pepsina ocurrió. Sin embargo, por la evidencia de los cromatogramas, existen otros compuestos presentes en las muestras, y es debido a ello que se requiere realizar la purificación de estas.

5.2 Recomendaciones

Materiales y equipo

- Utilizar un método cromatográfico de HPLC con un detector por arreglo de diodos con el fin de decidir qué pico representa un solo compuesto, o si es un pico de compuestos.
- Cerciorarse que la refrigeración de las muestras y otras condiciones de almacenamiento estén en perfecto estado, sin fluctuaciones de temperaturas o de otras variables que puedan afectar el proceso final.

Técnicos

- Investigar técnicas o procesos más productivos para separar las membranas testáceas de las cáscaras de huevo, para agilizar la extracción.
- Probar otros métodos de extracción por hidrólisis enzimática alternativos al actual, como por ejemplo hidrólisis enzimática con papaína. O realizar estudios con una enzima específica en condiciones diferentes de pH y temperatura.
- Intentar ver resultados con hidrólisis química, ya sea básica o ácida, y comparar con los resultados de este método enzimático.
- Purificar el ácido hialurónico mediante métodos por ejemplo de liofilización, fermentación bacteriana, ultrafiltración, entre otros.

A los estudiantes de Farmacia de la Universidad Internacional de las Américas

- Si algún estudiante quiera retomar este proyecto de investigación, se recomienda siempre tener presentes las condiciones de en qué se deben realizar todos los procesos, los materiales y el equipo, con el fin de agilizar el método.
- Además, tener un buen conocimiento teórico de aquellas variables presentes en la investigación, así como otras alternativas en caso de no poder obtener lo esperado.
- También tener muy claro cada paso a seguir antes de estar ejecutándolo, para una mayor comprensión de lo que ocurre.
- A los estudiantes que les guste el área de dermocosmética, pueden analizar este Trabajo Final de Graduación para la posible creación de un cosmético a base de ácido hialurónico, extraído de las membranas testáceas a partir de las cáscaras de huevo, como un suero tópico para hidratación de la piel, una crema reparadora, entre otros.

A la industria farmacéutica/cosmética

- Realizar más estudios sobre cómo extraer el ácido hialurónico de diferentes fuentes de obtención, y generar más conocimientos del tema.
- Buscar más opciones que sean rentables y eficaces para la extracción, que se puedan aplicar en esta área.

A la Universidad Internacional de las Américas y a profesores pertenecientes a esta

- Incentivar a los estudiantes a seguir realizando investigaciones experimentales en el laboratorio de la Universidad, para generar mayor conocimiento.
- Brindar las herramientas necesarias y apoyo para efectuar las tesis experimentales para un mejor cumplimiento de los objetivos que se vayan a plantear.
- Dar más accesibilidad en cuanto a horarios para tesistas que puedan desempeñar de la mejor manera las tareas respectivas.

CAPÍTULO VI-REFERENCIAS BIBLOGRÁFICAS

1. Martínez I. Corriente galvánica aplicada a la estética, en la ionización de ácido hialurónico como principio activo en el tratamiento de la deshidratación cutánea facial en pacientes de sexo femenino, de 25 a 35 años de edad que acuden al Centro Estético Mariana Mosquera Samán, en la ciudad de Guayaquil, de diciembre de 2013 a febrero del 2014 [Internet]. 2014. Disponible en: <http://repositorio.ucsg.edu.ec/bitstream/3317/1842/1/T-UCSG-PRE-MED-NUTRI-53.pdf>
2. Yoo J, Kim J, Yang H, Park K. Effects of eggshell membrane hydrolysates on UVB-radiation-induced wrinkle formation in SKH-1 hairless mice. [Internet]. 2015. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4682498/>
3. Alcalde M. Ácido hialurónico en aplicación tópica. Acofar. [Internet]. 2020. Disponible en: <https://revistaacofar.com/wp-content/uploads/2020/12/N-567.-Noviembre-Diciembre-2020.pdf>
4. Scardovi S, Goglian A, Gendra P, Gendra, C. Clinical study of the efficacy, duration and adverse effects of Hyaluronic Acid implants in the Oral-Maxillofacial area. [Internet]. 2017. Disponible en: <https://www.redalyc.org/jatsRepo/4796/479654215009/479654215009.pdf>
5. CORDIS. Separating eggshell and its membrane to turn eggshell waste into valuable source materials. [Internet]. 2015. Disponible en: <https://cordis.europa.eu/project/id/286910/reporting>
6. Aguilar A, García P, Rebollo N, Segura G, Ruiz J. Revisión de materiales de relleno. [Internet]. 2015. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2015/dcm1511.pdf>

7. Cocul'ová A, Krajcovic H. Isolation of the hyaluronic acid from the eggshell membranes. [Internet]. 2018. Disponible en: <http://www.ij sac.net/sites/default/files/2018-05/3.4.07.pdf>
8. Chan G, Estrada F, Sagastume M. Utilización de la yema y clara liofilizada y cáscara pulverizada del huevo de gallina para la fabricación de una línea cosmética con fines de cuidado de la piel. [Internet]. 2016. Disponible en: http://www.biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_3921.pdf
9. Campos F, Gómez E Cortez, F, Chamut S. Hialuronic acid in the eggshell of *Salvator merianae* (Squamata: Teiidae). [Internet]. 2020. Disponible en: <https://ranar.faz.unt.edu.ar/index.php/ranar/article/view/77>
10. Lee B, Han D, Choi W. Rejuvenating effects of facial hydrofilling using restylane vital. [Internet]. 2015. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4439586/>
11. Hernández R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la investigación. México: McGraw-Hill; 2014.
12. Heaney R, Robinson D. The isolation and characterisation of hyaluronic acid in eggshell. [Internet]. 1976. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1009103/>
13. Guerra A, Gómez E. El ácido hialurónico y sus aplicaciones en dermatología. [Internet]. 1998. Disponible en: <https://www.actasdermo.org/es-el-acido-hialuronico-sus-aplicaciones-articulo-13003360>

14. Long F, Adams R, Devore D. Preparation of hyaluronic acid from eggshell membrane. [Internet]. 2004. Disponible en: <https://patents.google.com/patent/WO2004080388A2/en>
15. Oba, C, Ohara H, Morifuji M, Ito K., Ichikawa S., Kawahata K, et al. Collagen hydrolysate intake improves the loss of epidermal barrier function and skin elasticity induced by UVB irradiation in hairless. *Photodermatology, photoimmunology and photomedicine* [Internet]. 2013; 29 (4), 204-211. Disponible en: doi: 10.1111 / phpp.12051
16. Urbano E. Extracción a escala de laboratorio del complejo de proteínas presentes en las membranas intersticiales de residuos de cáscaras de huevo de gallina (*Gallus Domesticus*) mediante el proceso de hidrólisis alcalina. [Internet]. 2015. Disponible en: <https://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/10458>
17. Monferrer A, Cubero N. Método de obtención de un producto cicatrizante y producto cicatrizante obtenido. [Internet]. 2016. Disponible en: <https://patentimages.storage.googleapis.com/95/2b/9c/ae073830af1f1c/WO2016055676A1.pdf>
18. Santa C, Aristizábal A, Pérez C. Estrategias antienvjecimiento. *Dermatología CMQ*. [Internet]. 2017. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2017/dcm172i.pdf>
19. Kalman D, Hewlings S. The effect of oral hydrolyzed eggshell membrane on the appearance of hair, skin, and nails in healthy middle-aged adults: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. [Internet]. 2019. Disponible en: DOI: 10.1111/jocd.13275

20. González F, Bravo L. Historia y actualidad de productos para la piel, cosméticos y fragancias. Especialmente los derivados de las plantas. [Internet]. 2017. Disponible en: <https://scielo.isciii.es/pdf/ars/v58n1/2340-9894-ars-58-1-5.pdf>
21. Sabater I, Mourelle L. Cosmetología para estética y belleza. [Internet]. 2012. Disponible en: <https://www.mheducation.es/bcv/guide/capitulo/8448180771.pdf>
22. Padilla, E, Flores M, García J, Urzúa E, Lugon E, García Z. Cosméticos y cosmeceúticos en México. [Internet]. 2015. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/saljalisco/sj-2015/sj152e.pdf>
23. González A. Inducción de tolerancia oral a niños con alergia a proteínas de huevo. Detección de posibles factores predictores de reacciones adversas y tolerancia. [Internet]. 2017. Disponible en: https://addi.ehu.es/bitstream/handle/10810/26894/TESIS_GONZALEZ_HERMOSA_ANDRES.pdf?sequence=1&isAllowed=y
24. Mosquera T. La investigación en la cosmética natural. Editorial Universitaria Abyaya. [Internet]. 2015. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/19015/1/La%20investigacion%20de%20la%20cosmetica%20natural.pdf>
25. Rojas J. Estudio de estabilidad acelerada en lotes piloto de un gel exfoliante elaborado a base de cáscara de huevo por medio de la cuantificación de calcio disuelto. [Internet]. 2011. Disponible en: <https://biblioteca-farmacia.usac.edu.gt/Tesis/QF1269.pdf>
26. Mesa A, Flórez S, Sanclemente G. Mechanisms of skin aging. [Internet]. 2017. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2017/dcm172i.pdf>

27. Vélez C, Aristizábal A, Pérez C. Anti-aging strategies. [Internet]. 2017. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2017/dcm172i.pdf>
28. Bertucci V, Lynde C. Current concepts in the use of small-particle hyaluronic acid. [Internet]. 2015. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26441093/>
29. Ruiz M, Morales M. Aproximación al tratamiento del envejecimiento cutáneo. [Internet]. 2015. Disponible en: <https://scielo.isciii.es/pdf/ars/v56n4/revision1.pdf>
30. Góngora M, Magaña A, Montiel, J, Pantoja C, Pineda M, Piñeyro E. Alergia a las proteínas del huevo en edad pediátrica. [Internet]. 2015. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/4867/486755027004.pdf>
31. Valverde D. Desarrollo y caracterización de nuevos productos a partir de la yema de huevo y de sus fracciones. [Internet]. 2015. Disponible en: https://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/handle/10651/31219/TFM_DamianValverdeGarcia.pdf?sequence=6
32. Torres K. Estudio de factibilidad para la elaboración de una crema hidratante a base de cáscaras de huevo en la ciudad de Ambato, provincia de Tungurahua [Tesis de Ingeniería]. Universidad Técnica de Ambato, Ecuador. [Internet]. 2021. Disponible en: <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/33675/1/BQ%20292.pdf>
33. Zubeldia J, Baeza M, Chivato T, Jáuregui I, Senent C. Libro de las enfermedades alérgicas de la Fundación BBVA. España: Editorial Nerea, S.A. [Internet]. 2012. Disponible en: https://www.fbbva.es/wp-content/uploads/2021/10/Libro-enfermedades-alergicas_FBBVA.pdf
34. Abdou A, Mujo K, Kenji S. Functional proteins and peptides of hen's egg origin. [Internet]. 2013. Disponible en: DOI: 10.5772 / 54030

35. García T. Extracción y aplicaciones alimentarias de membranas de cáscaras de huevo. [Internet]. 2015. Disponible en: https://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/handle/10651/32400/TFM_TaniaGarciaCampos.pdf;jsessionid=A3E1E3E14DCFAFA0AC6345B3FBAA8E5D?sequence=3
36. Castro H. Evaluación de la edad de la gallina, de la temperatura y el tiempo de almacenamiento sobre la penetración bacteriana en huevo e influencia de la aplicación de recubrimiento de aceite sobre la calidad del huevo durante el almacenamiento. [Internet]. 2017. Disponible en: <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/bitstream/123456789/4336/1/41388.pdf>
37. Rodríguez A, Domínguez N, Muñoz A, Ortega M. Change in the chicken eggshell cuticle with hen age and egg freshness. [Internet]. 2013. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579119384184?via%3Dihub>
38. Li J, Liao X, Zhang Q, Shi B. Adsorption and separation of proteins by collagen fiber adsorbent. [Internet]. 2013. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S157002321300202X?via%3Dihub>
39. Ramírez S, Miranda B, Rodríguez C. Purificación de proteínas. [Internet]. 2021. Disponible en: <http://bq.facmed.unam.mx/tab/wp-content/uploads/2021/06/7-Rodriguez-Purificacion.pdf>
40. Campion, E M, Loughran ST, Walls D. Protein Quantitation and Analysis of Purity. Methods Mol Biol. [Internet]. 2017. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27730556/>
41. La Nuez M, Aguirre A. Procedimiento y composición de hidrolización de membrana de cáscara de huevo. [Internet]. 2018. Disponible en:

<https://patentimages.storage.googleapis.com/1a/3a/38/1c08580ce461b6/ES2633062B2.pdf>

42. Strohbehn R, Etzel L, Figgins J. Solubilized protein composition obtained from eggshell membrane. (United States Patent No. 8 173 174 B2). [Internet]. 2012. Disponible en: <https://patentimages.storage.googleapis.com/4f/e0/d4/dc7b16ed28ea6b/US8211477.pdf>
43. Acevedo A. Caracterización de pepsina de sábalo (*Prochilodus lineatus*): evaluación de su potencial aplicación industrial. [Internet]. 2019. Disponible en: <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/80943>
44. Abatangelo G, Vindigni V, Avruscio G., Pandis L, Brun P. Hyaluronic acid: redefining its role. [Internet]. 2020. doi:10.3390/cells9071743
45. Instituto Químico Biológico [Internet]. España: IQB [Internet]. 2012. Disponible en: <https://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/a129.htm>
46. Pérez B, Meza R, Ventura L, Enciso S, Abud M, Villalobos J, et al. Optimization of the hyaluronic acid extraction method of the vitreous humor of *Oreochromis niloticus*. Rev Agroproductividad [Internet].2018 11(6):128-134. Disponible en: <https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/443/323>
47. Delgadillo Arone J. Caracterización bioquímica, biológica, molecular y funcional de la enzima hialuronidasa del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox* “Jergon de la Selva” [Tesis para Magíster en Biología Molecular]. Lima, Perú: Universidad del Perú; 2019.

48. Castaño O, Muñoz M, Campo J, Martínez G, Cano J. Current status of Visco supplementation with hyaluronic acid in the treatment of temporomandibular disorders: a systematic review. [Internet]. 2017. Disponible en: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1130055816300508?token=A63F8A8B738127C1F0F1D01610377F63B755EE65F29995267A37F13C44D7E700927655F1328333848DB21CE4B0643420&originRegion=us-east-1&originCreation=20220310212044>
49. Díaz I. Ácido hialurónico reticulado y no reticulado - diferencias. [Internet]. 2019. Disponible en: <https://www.dr Diazinfante.es/blog/acido-hialuronico-diferencias>
50. Atarés L. Determinación de la densidad de un líquido con el método del picnómetro. [Internet]. 2011. Disponible en: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/12655/11.%20Art%C3%ADculo%20docente.%20Determinaci%C3%B3n%20de%20la%20densidad%20de%20un%20l%C3%ADquido%20con%20el%20m%C3%A9todo%20del%20picn%C3%B3metro.pdf?sequence=1>
51. Macías M, Espinoza P, Suazo S, Jiménez A, Rubio F, Breve L. Aplicación clínica del ácido hialurónico. [Internet]. 2015. Disponible en: <http://www.bvs.hn/RFCM/pdf/2015/pdf/RFCMVol12-2-2015-6.pdf>
52. Berasategui U. Consejo farmacéutico en condroprotección. [Internet]. 2020. Disponible en: <https://revistaacofar.com/wp-content/uploads/2020/12/N-567.-Noviembre-Diciembre-2020.pdf>
53. González S, Soto M. Eficacia del ácido hialurónico en el tratamiento de las enfermedades articulares. Rev Cubana de Reumatol 2018; 20(3):e642. [Internet]. 2018. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1817-59962018000300006

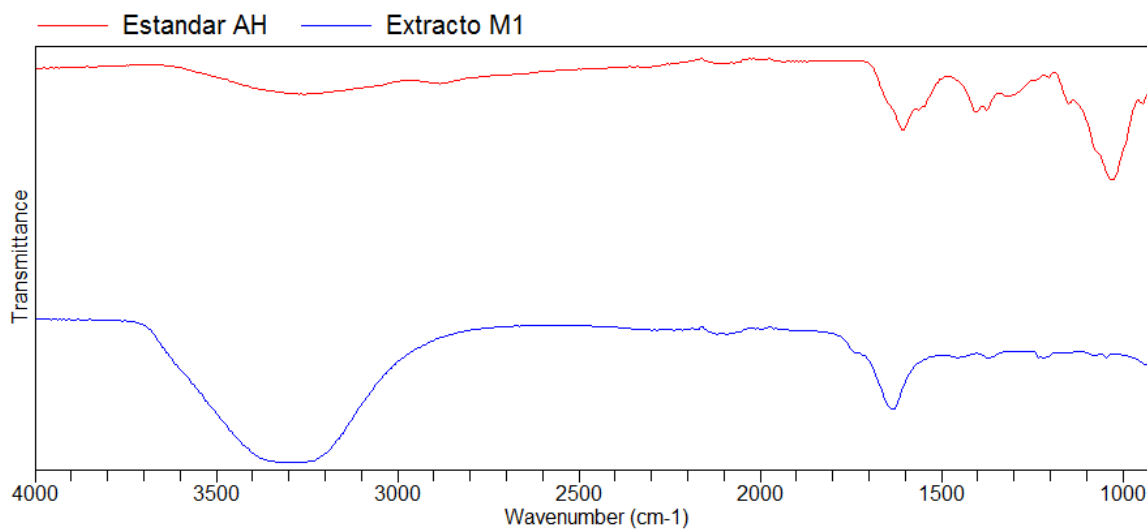
54. Hernández M. Valoración de la efectividad del ácido hialurónico en la cicatrización de zonas donantes. [Internet]. 2020. Disponible en: <https://gredos.usal.es/bitstream/handle/10366/144225/HERN%C3%81NDEZ%20VICENTE%2C%20M%C2%AA%20Rosana.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
55. Xu H, Zhang L, Bao Y, Yan X, Yin Y, Li, Y, et al. Preparation and characterization of injectable chitosan-hyaluronic acid hydrogels for nerve growth factor sustained release. [Internet]. 2016. Disponible en: <https://doi.org/10.1177/0883911516662068>
56. Casedei A, Epis R, Ferroni L, Tocco I, Gardin C, Bressan E, et al. Adipose tissue regeneration: a state of the art. [Internet]. 2012. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2012/462543>
57. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Guía sobre aceites esenciales en productos cosméticos. [Internet]. 2018. Disponible en: https://www.aemps.gob.es/publicaciones/publica/docs/Guia_Aceites_Esenciales.pdf
58. Cevallos I. Técnicas de identificación y cuantificación de los principios activos con potencial uso en el sector cosmético encontrados en las especies del género *Opuntia* de la familia Cactaceae. [Internet]. 2018. Disponible en: <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/14470/Monograf%c3%ada%20Mabel%20Cevallos.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
59. Vicario A. Desarrollo de metodologías analíticas modernas destinadas a la determinación de sustancias prohibidas y/o restringidas, para el control de calidad de productos cosméticos. [Internet]. 2018. Disponible en: https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/80965/CONICET_Digital_Nro.6bd9f9fde-1700-4983-9e03-465331caecf3_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y

60. Suarez D, Morales Y. Principios básicos de la cromatografía líquida de alto rendimiento para la separación y análisis de mezclas. [Internet]. 2018. Disponible en: <http://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/7731/1/6131978-2018-1-IQ.pdf>
61. Mayolo K, Martínez L, Rito M. Técnicas cromatográficas y su aplicación a estudios de cambios conformacionales, estabilidad y replegamiento de proteínas. [Internet]. 2012. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382012000300006#:~:text=La%20cromatograf%C3%ADa%20de%20exclusi%C3%B3n%20molecular,y%20col.%2C%202004.
62. Venegas P. Evaluación de las condiciones experimentales para la extracción de aceite esencial de romero para su uso como antioxidante en aceites comerciales. [Internet]. 2016. Disponible en: <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/bitstream/123456789/4008/1/40654.pdf>
63. Frola P, Velásquez, J. Competencias de docentes para la evaluación cualitativa del aprendizaje. [Internet]. 2011. Disponible en: http://secgral4.edu.mx/documentos/planeacion_argumentada/evaluacion_cualitativa_aprendizaje.pdf
64. ASALE R, RAE. Diccionario de la lengua española RAE - ASALE. “Diccionario de La Lengua Española” - Edición del Tricentenario. [Internet]. 2020. Disponible en: <https://dle.rae.es/cuantificaci%C3%B3n>
65. Úrgeová E, Vulganová K. Comparison of enzymatic hydrolysis of polysaccharides from eggshells membranes. [Internet]. 2016. Disponible en: <https://doi.org/10.1515/nbec-2016-0014>

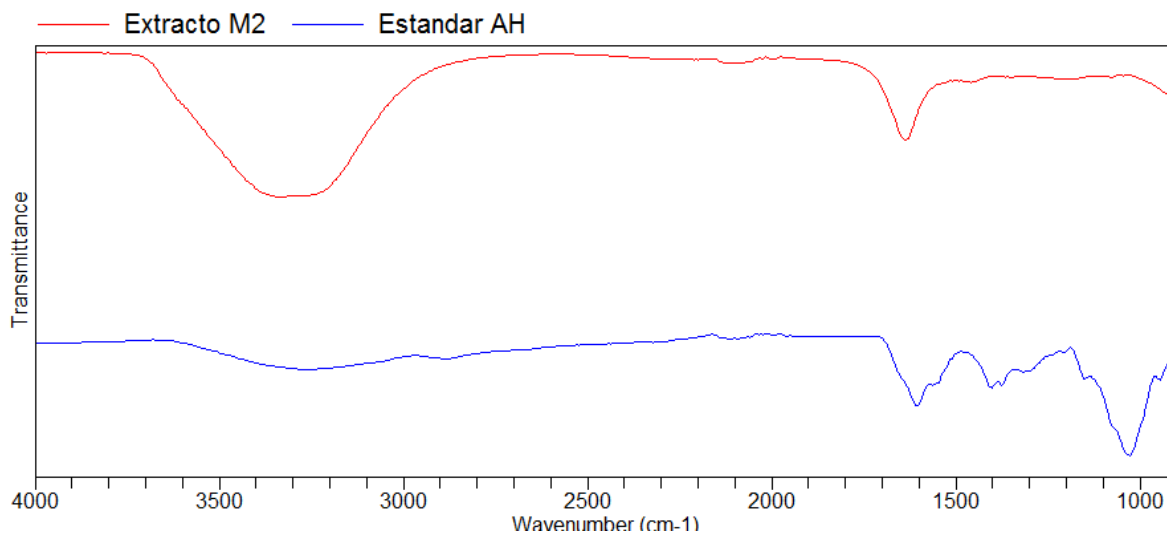
66. Campos G, Lule N. La observación, un método para el estudio de la realidad. [Internet]. 2012. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3979972>
67. Abad A. Análisis de contenidos con enfoque cuantitativo. [Internet]. 2020. Disponible en: <https://www.ucuenca.edu.ec/component/content/article/233-espanol/investigacion/blog-de-ciencia/1599-analisis-de-contenido?Itemid=437>
68. Sánchez M, Martín M, García F, Muñoz J., Pinto A., Parra E, et al. Análisis de contenido cualitativo: estudio de la satisfacción de los usuarios sobre la presentación de un nuevo medicamento en la salud pública. [Internet]. 2017. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Francisco-Garcia-Penalvo/publication/318663128_Analisis_de_contenido_cualitativo_Estudio_de_la_satisfaccion_de_los_usuarios_sobre_la_presentacion_de_un_nuevo_medicamento_en_la_salud_publica/links/597674220f7e9b4016bc4879/Analisis-de-contenido-cualitativo-Estudio-de-la-satisfaccion-de-los-usuarios-sobre-la-presentacion-de-un-nuevo-medicamento-en-la-salud-publica.pdf
69. Ruckmani K, Shaikh S, Khalili P, Muneera M, Thusleem O. Determination of sodium hyaluronate in pharmaceutical formulations by HPLC–UV. [Internet]. 2013. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2013.02.001>
70. Lera A. Aplicaciones enzimáticas en procesos de conservación y restauración de obras de arte. Consolidación de celulosa. Capítulo I: Las enzimas. [Internet]. 2011. Disponible en: <https://addi.ehu.es/bitstream/handle/10810/14292/4-%20Cap%20I.%20Las%20enzimas.pdf?sequence=4&isAllowed=y>
71. Fariña A. Biosíntesis de ácido hialurónico en *Saccharomyces cerevisiae*. [Internet]. 2019. Disponible en: <https://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/174947/Biosintesis-de-acido-hialuronico.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

72. Santosh Y, Dharmendra J., Nataraj V., Velankar H., Kapat A, Rangaswamy W. Procedimiento para la purificación de ácido hialurónico de elevado peso molecular. [Internet]. 2013. Disponible en: <https://patentimages.storage.googleapis.com/64/bd/c0/98df23025616f3/ES2396955T3.pdf>
73. González L, Alviar, J, Cano H. Análisis infrarrojo del hialucorp, metacorp y silicona líquida en el marco de la alopecia iatrogénica. [Internet]. 2017. Disponible en: <https://www.ciplastica.com/ojs/index.php/rccp/article/viewFile/37/pdf>
74. Manju S, Sreenivasan K. Conjugation of curcumin onto hyaluronic acid enhances its aqueous solubility and stability. [Internet]. 2011. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.03.07>
75. Cortez P. Análisis de los espectros de infrarrojo. En Principios y aplicaciones de la espectroscopia de infrarrojo en el análisis de alimentos y bebidas (66-82). Guadalajara: CIATEJ. [Internet]. 2020. Disponible en: <https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1023/743/1/Cap%206%20Analisis%20de%20los%20espectros%20de%20infrarrojo.pdf>
76. Mondragón P. Espectroscopia de infrarrojo para todos... y 51 espectros de alimentos consumidos en México. [Internet]. 2017. Disponible en: https://ciatej.mx/files/divulgacion/divulgacion_5a43b7c09fdc1.pdf

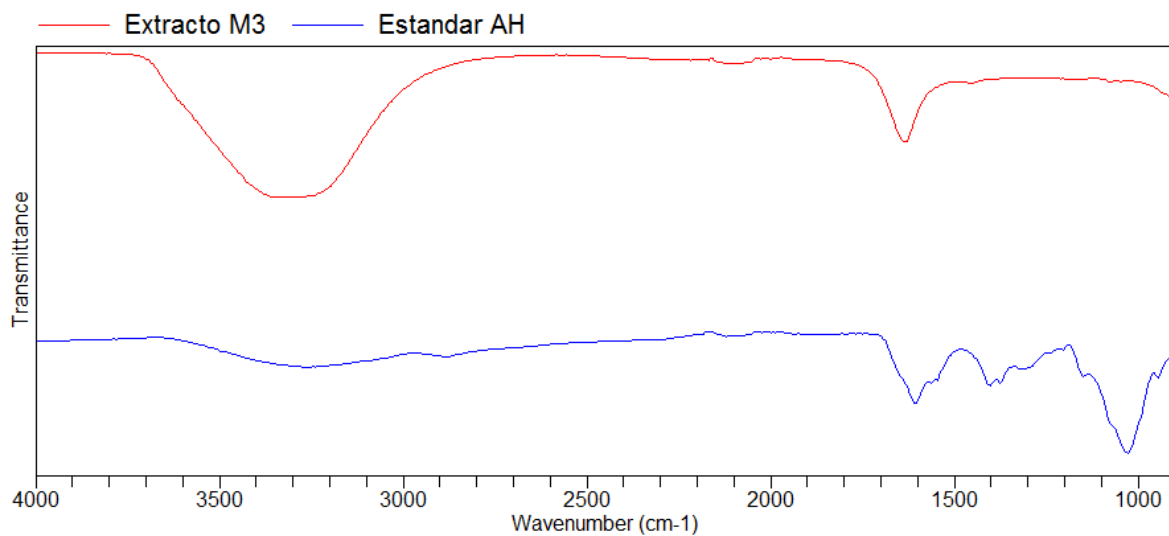
CAPÍTULO VII- ANEXOS

Anexo 1. Comparación de Muestra 1 con estándar de AH de manera individualizada

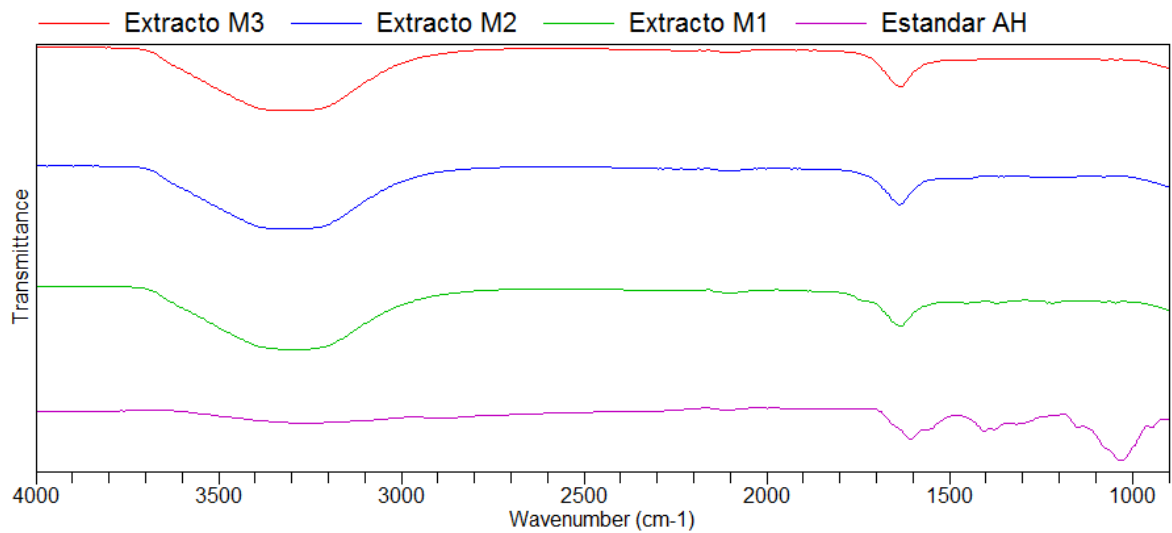
Fuente: elaboración propia.

Anexo 2. Comparación de Muestra 2 con estándar de AH de manera individualizada

Fuente: elaboración propia.

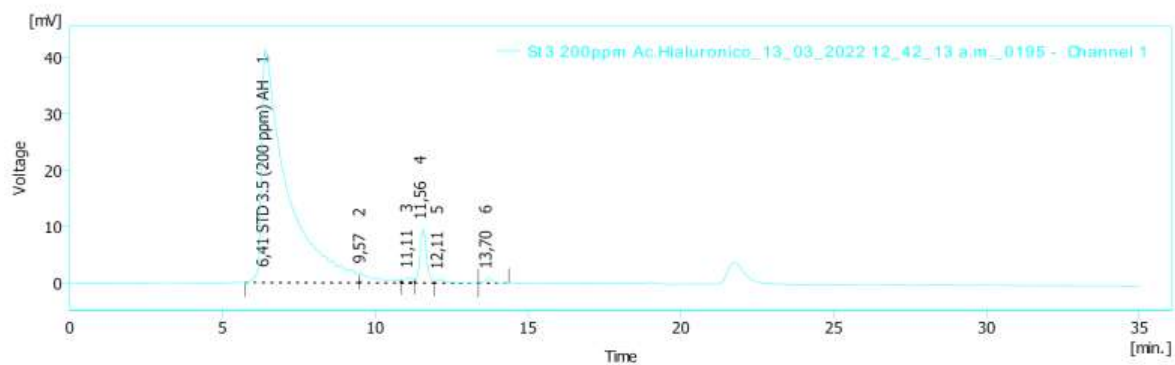
Anexo 3. Comparación de Muestra 3 con estándar de AH de manera individualizada

Fuente: elaboración propia.

Anexo 4. Comparación de Muestras con estándar de AH de manera individualizada

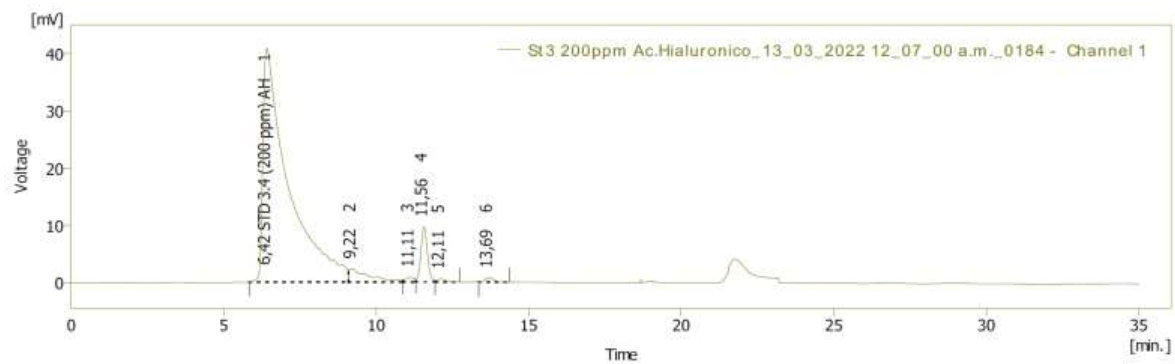
Fuente: elaboración propia.

Anexo 5. Cromatograma HPLC del estándar 3.5



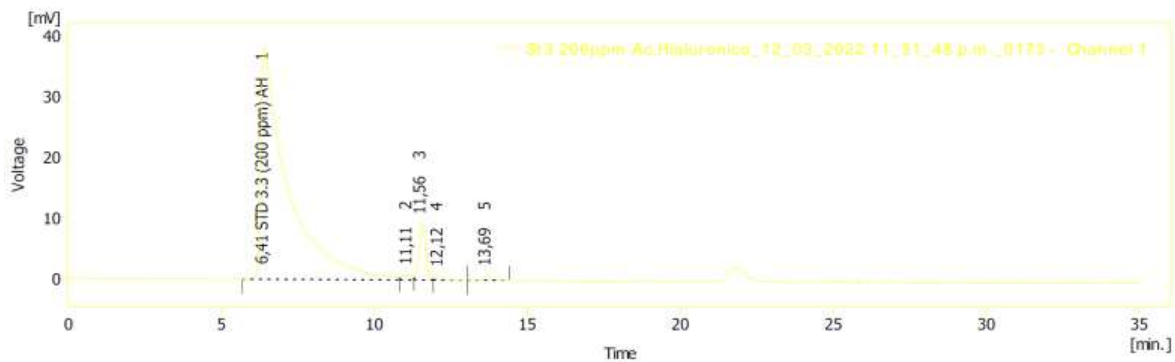
Fuente: elaboración propia.

Anexo 6. Cromatograma HPLC del estándar 3.4



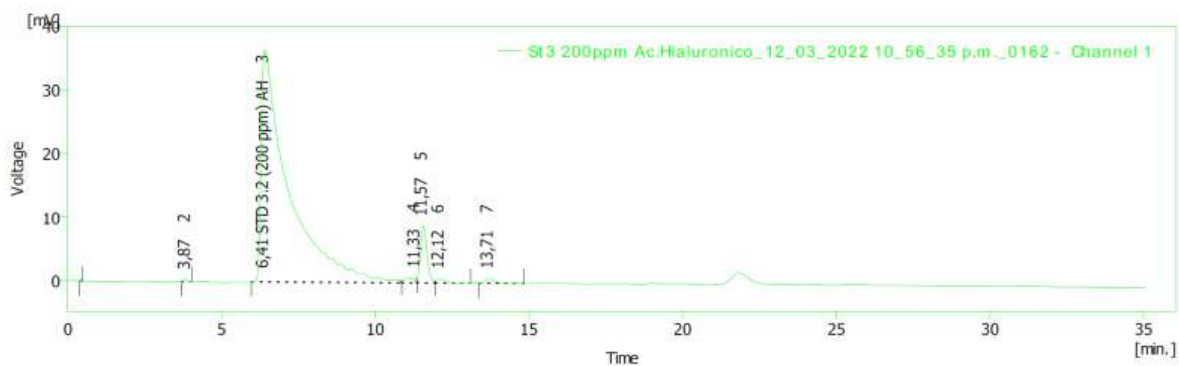
Fuente: elaboración propia.

Anexo 6. Cromatograma HPLC del estándar 3.3



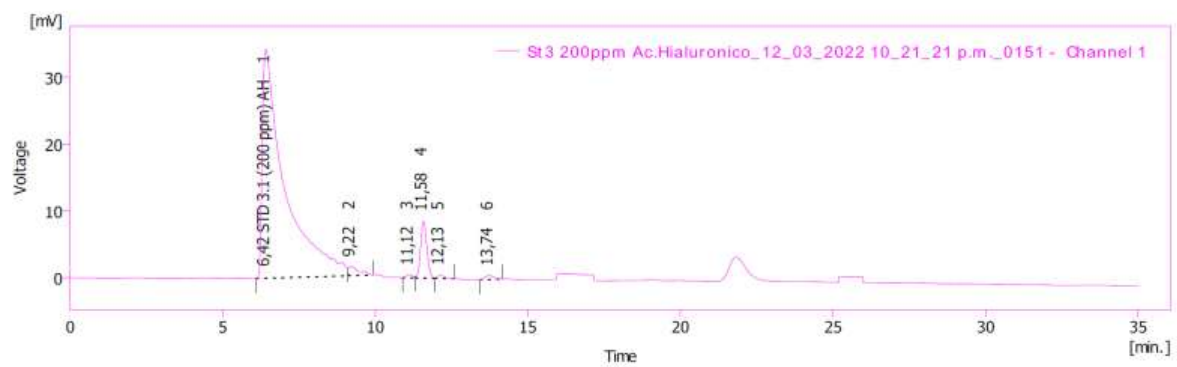
Fuente: elaboración propia.

Anexo 7. Cromatograma HPLC del estándar 3.2



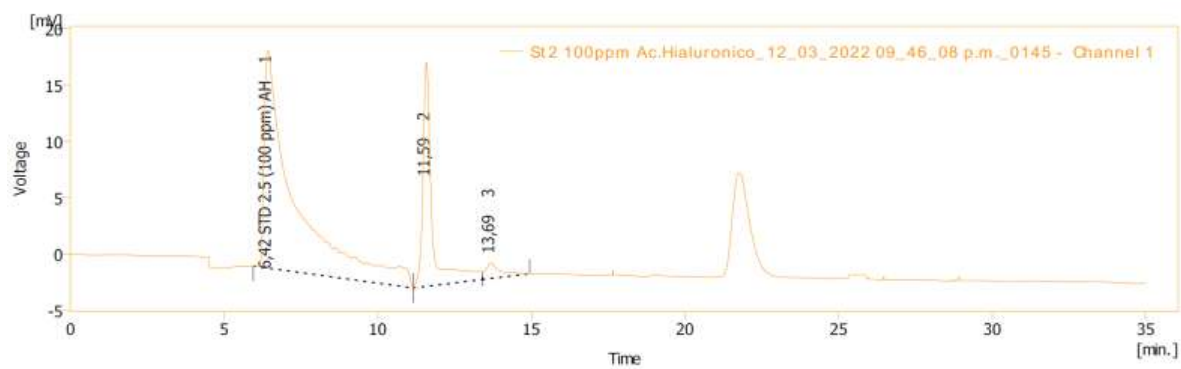
Fuente: elaboración propia.

Anexo 8. Cromatograma HPLC del estándar 3.1



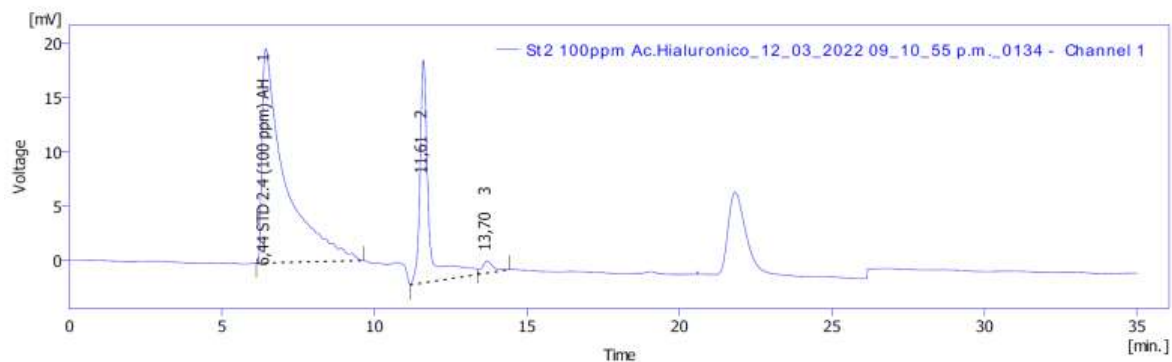
Fuente: elaboración propia.

Anexo 9. Cromatograma HPLC del estándar 2.5



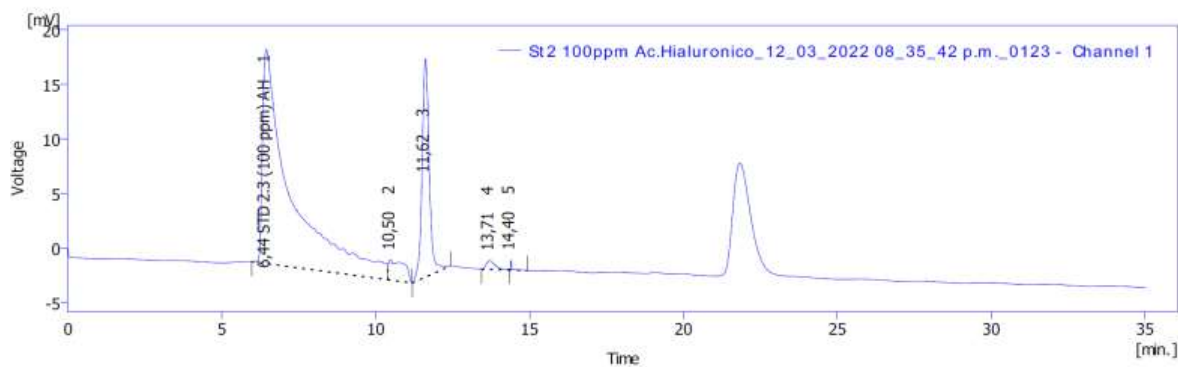
Fuente: elaboración propia.

Anexo 10. Cromatograma HPLC del estándar 2.4



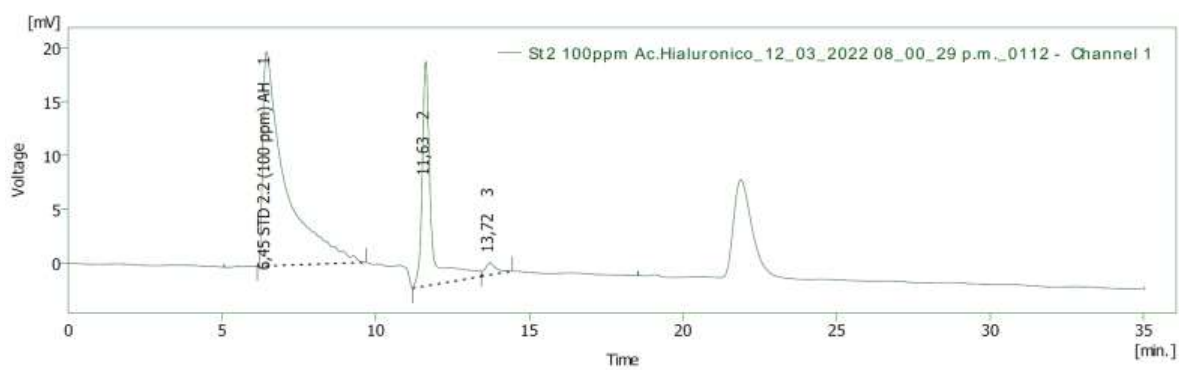
Fuente: elaboración propia.

Anexo 11. Cromatograma HPLC del estándar 2.3



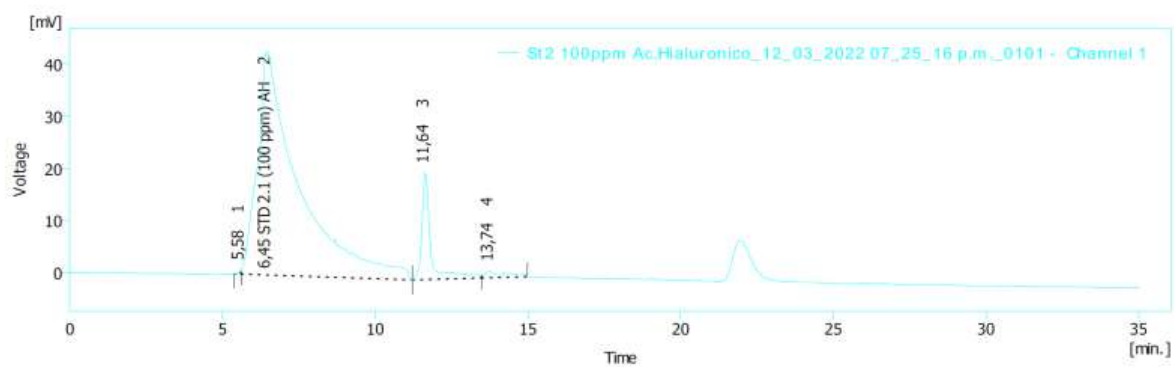
Fuente: elaboración propia.

Anexo 12. Cromatograma HPLC del estándar 2.2



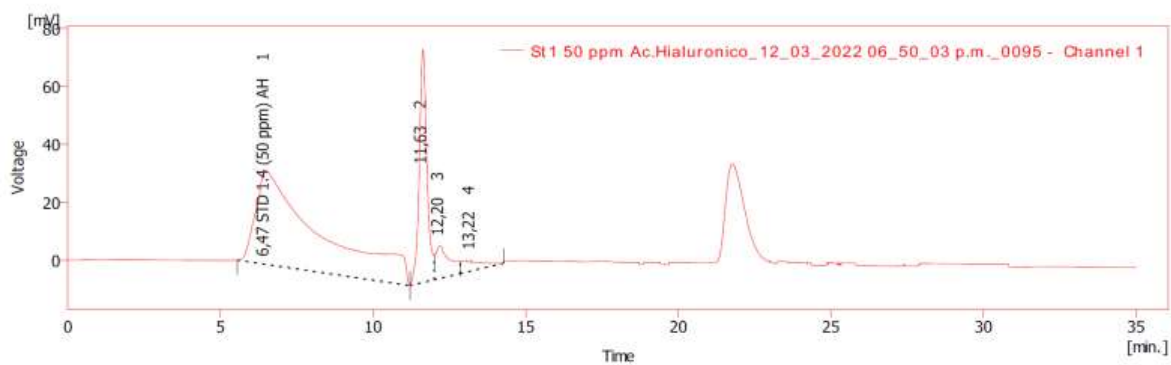
Fuente: elaboración propia.

Anexo 13. Cromatograma HPLC del estándar 2.1



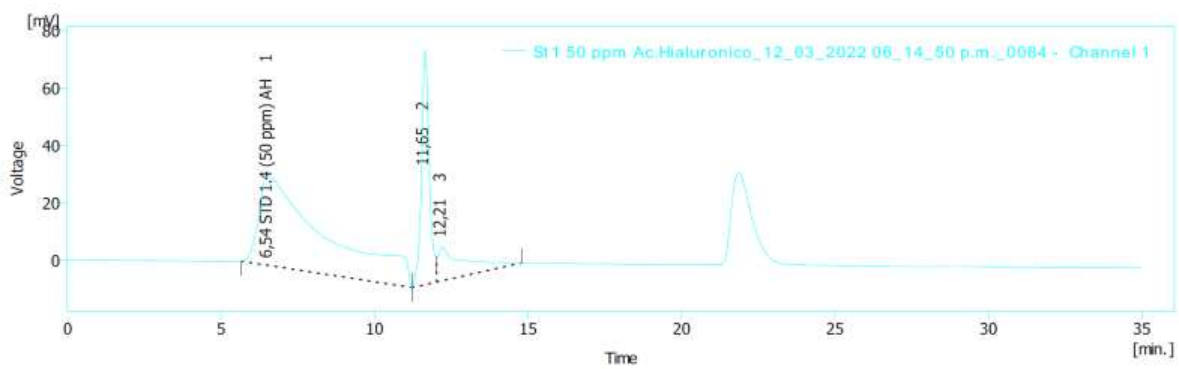
Fuente: elaboración propia.

Anexo 14. Cromatograma HPLC del estándar 1.5



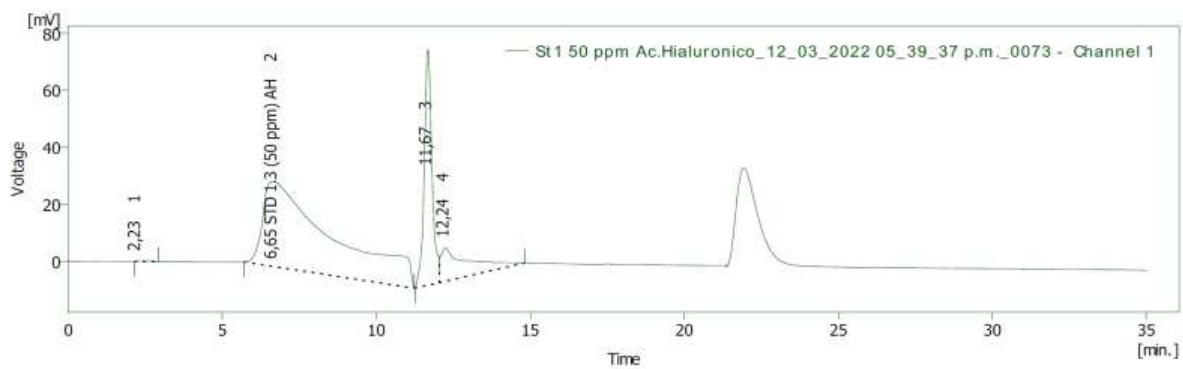
Fuente: elaboración propia.

Anexo 15. Cromatograma HPLC del estándar 1.4



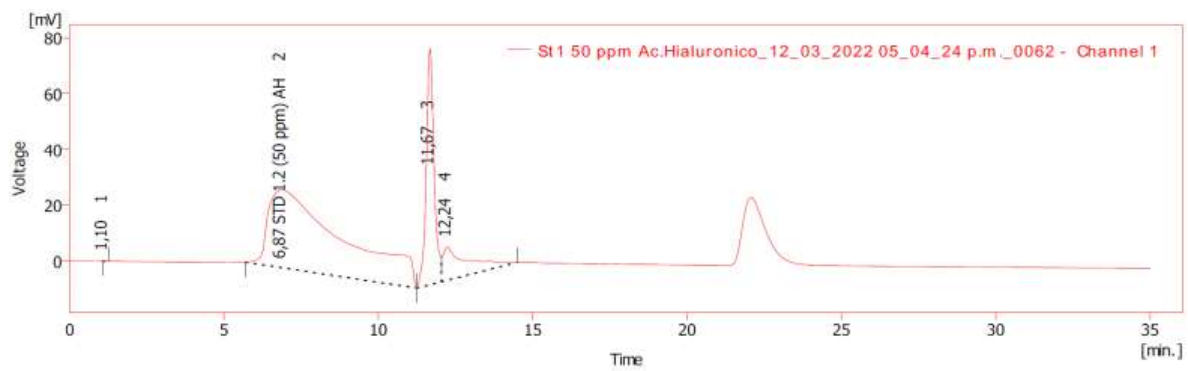
Fuente: elaboración propia.

Anexo 16. Cromatograma HPLC del estándar 1.3



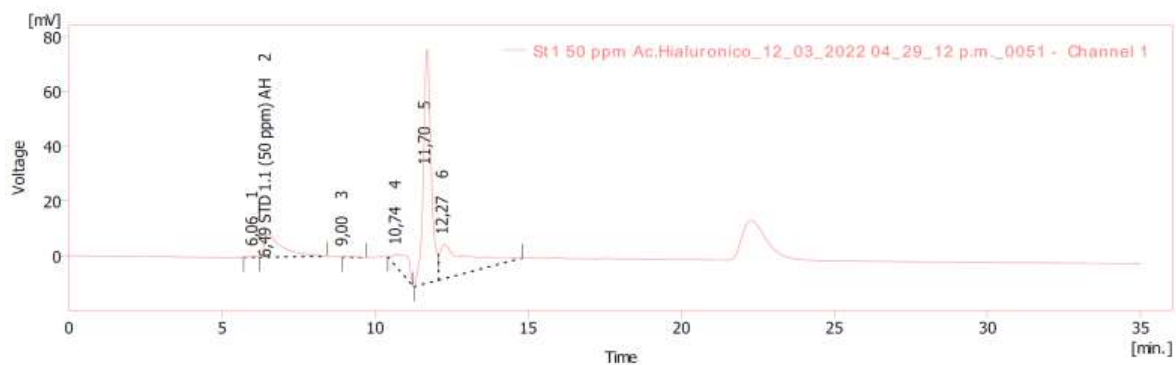
Fuente: elaboración propia.

Anexo 17. Cromatograma HPLC del estándar 1.2



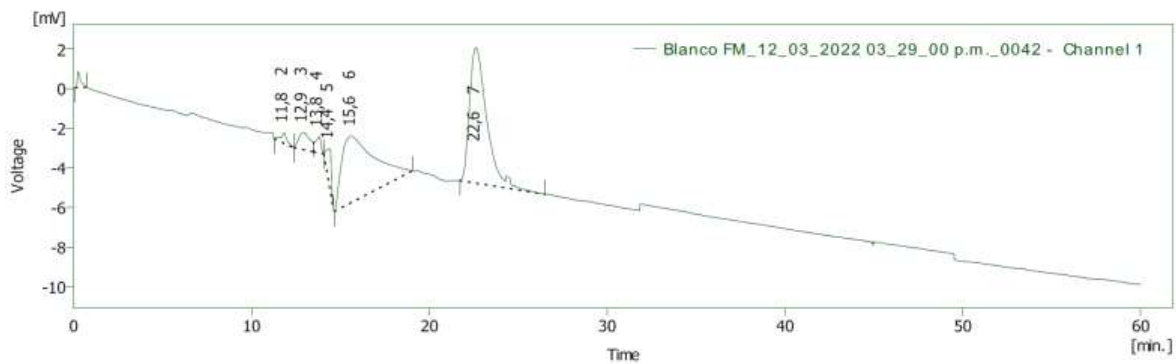
Fuente: elaboración propia.

Anexo 18. Cromatograma HPLC del estándar 1.1



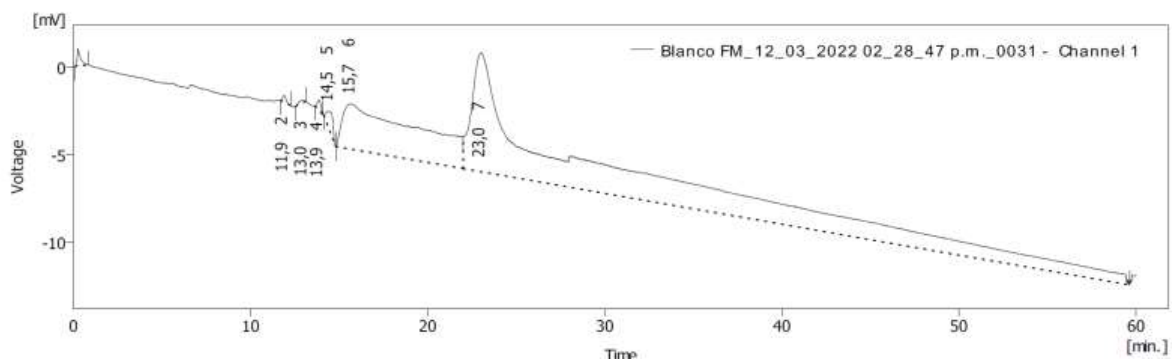
Fuente: elaboración propia.

Anexo 19. Cromatograma HPLC del blanco de Fase Móvil 1



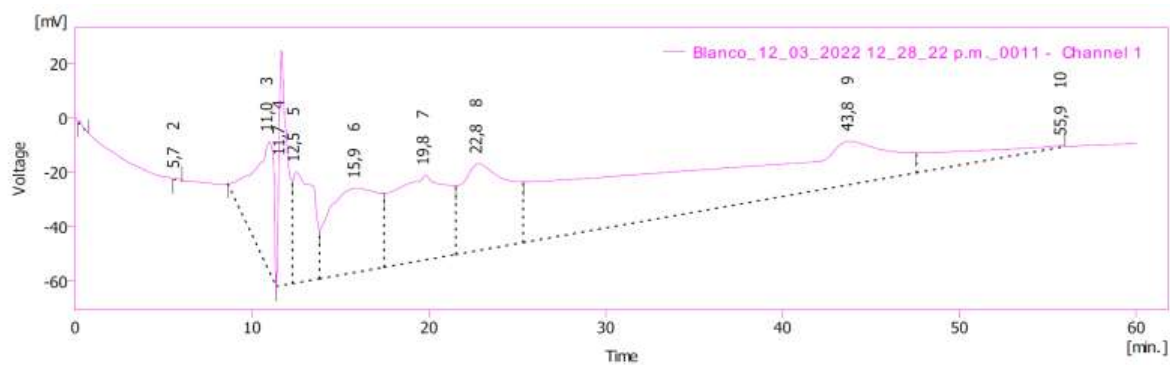
Fuente: elaboración propia.

Anexo 20. Cromatograma HPLC del blanco de Fase Móvil 2



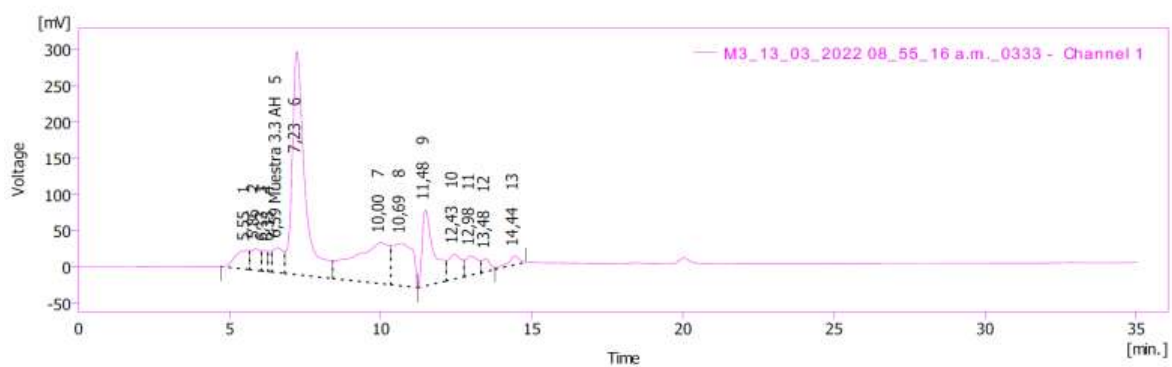
Fuente: elaboración propia.

Anexo 21. Cromatograma HPLC del blanco de muestras



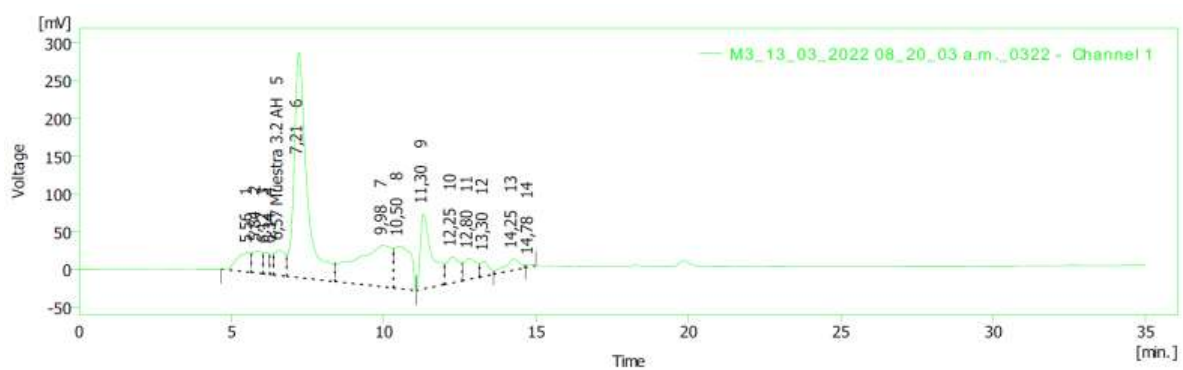
Fuente: elaboración propia.

Anexo 22. Cromatograma HPLC de la muestra 3.3



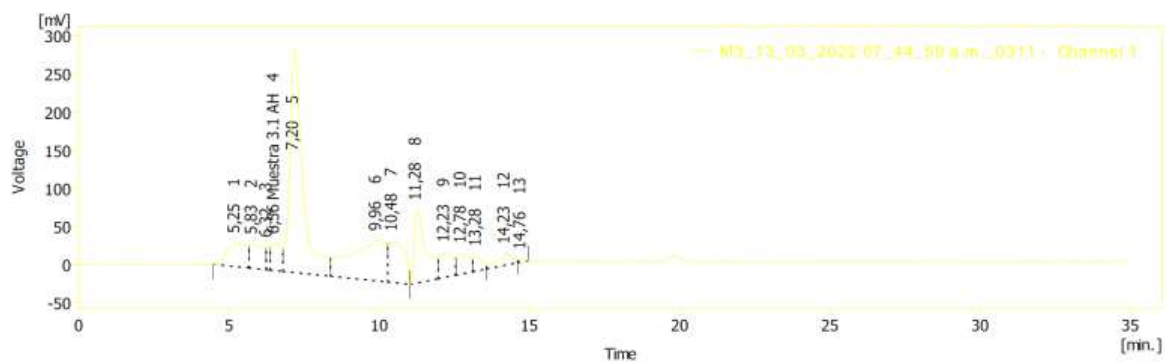
Fuente: elaboración propia.

Anexo 23. Cromatograma HPLC de la muestra 3.2



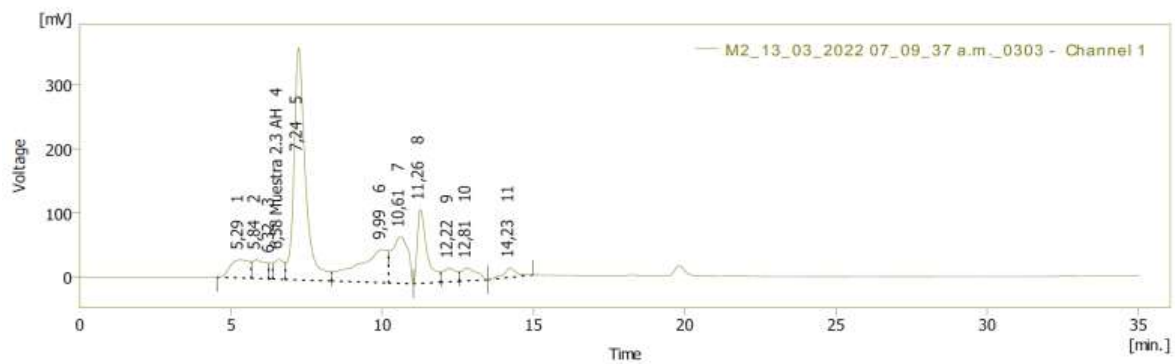
Fuente: elaboración propia.

Anexo 24. Cromatograma HPLC de la muestra 3.1



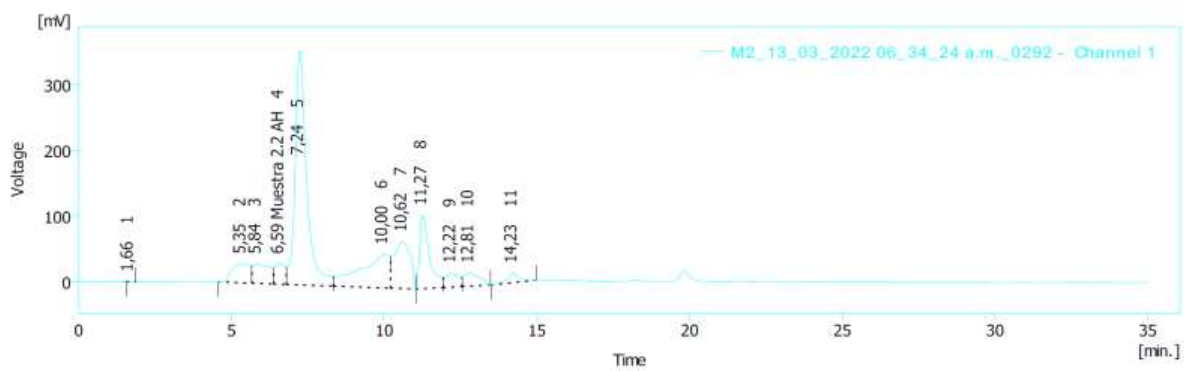
Fuente: elaboración propia.

Anexo 25. Cromatograma HPLC de la muestra 2.3



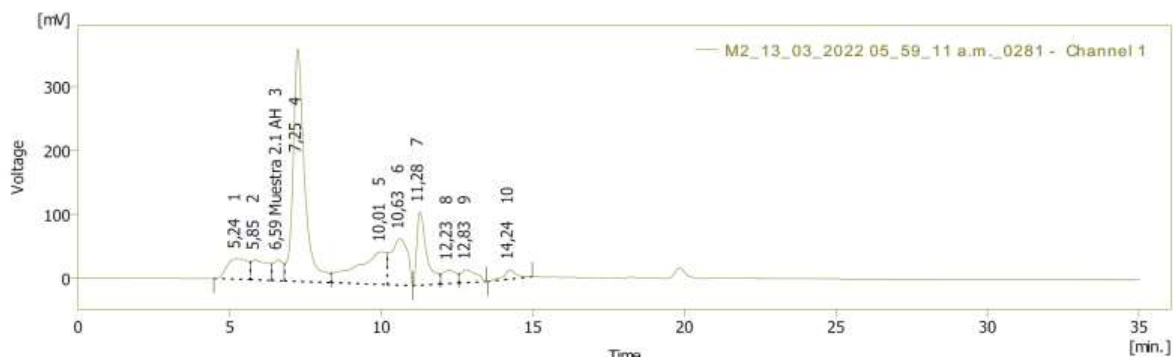
Fuente: elaboración propia.

Anexo 26. Cromatograma HPLC de la muestra 2.2



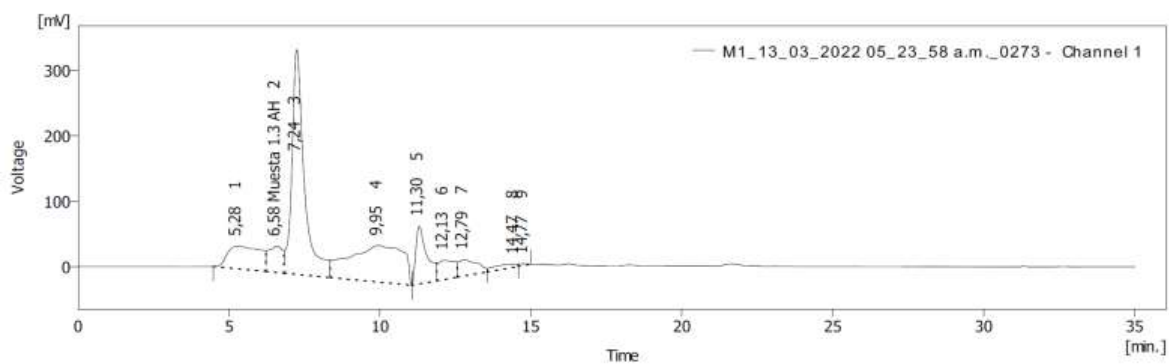
Fuente: elaboración propia.

Anexo 27. Cromatograma HPLC de la muestra 2.1



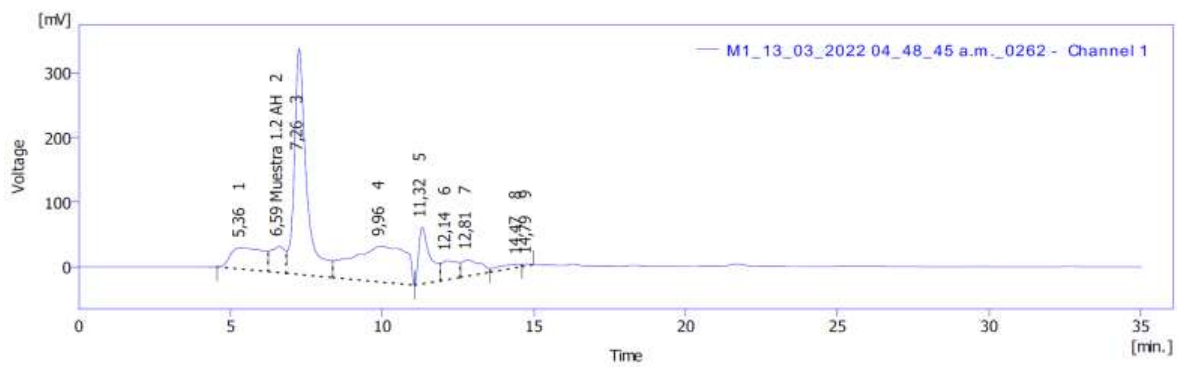
Fuente: elaboración propia.

Anexo 28. Cromatograma HPLC de la muestra 1.3

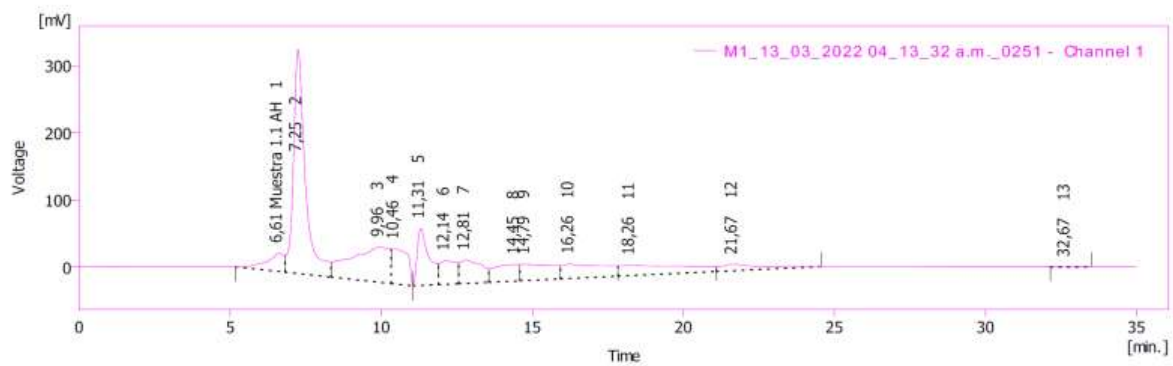


Fuente: elaboración propia.

Anexo 29. Cromatograma HPLC de la muestra 1.2



Fuente: elaboración propia.

Anexo 30. Cromatograma HPLC de la muestra 1.1

Fuente: elaboración propia.