



Universidad Michoacana de San Nicolás de  
Hidalgo

---

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA  
LABORATORIO DE ANALISIS DEALIMENTOS

**OBTENCIÓN DE CALCIO MEDIANTE UNA  
HIDRÓLISIS ÁCIDA DEL CASCARÓN DE HUEVO  
DE GALLINA Y VERIFICACIÓN DE SU  
BIODISPONIBILIDAD MEDIANTE UN ENSAYO  
BIOLÓGICO.**

TESIS  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

P R E S E N T A  
**P.Q.F.B. Nambo Santiago Eder Noé**

Asesora de Tesis  
Q.F.B. Cornelio Moreno María Gloria

Coasesora  
M.C. Maya Cortés Diana Cecilia



Morelia, Mich. Julio de 2021

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMNSH), al programa de Químico Farmacobiología, y en particular al Laboratorio de Alimentos por las facilidades otorgadas para llevar a cabo este trabajo de investigación.

A mi asesora, Q.F.B. María Gloria Cornelio Moreno, y mi coasesora, M.C. Diana Cecilia Maya Cortés, por el apoyo brindado para la realización de mi tesis.

Al Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Alimentos (LIDA) de la UMSNH, Laboratorio de Análisis de Alimentos de la UMSNH y al Laboratorio de Ciencias en Ingeniería Ambiental por la ayuda brindada al presente trabajo.

## **DEDICATORIA**

### **A MIS PADRES**

Daniel y Ofelia por su orientación, motivación y confianza, porque me han dado una formación integral.

### **A MI NOVIA**

Karla, por su amor y apoyo incondicional que me brindado en todo momento.

# ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS .....	I
DEDICATORIA.....	I
ÍNDICE GENERAL.....	II
ÍNDICE DE FIGURAS .....	IV
ÍNDICE DE TABLAS .....	VI
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	VII
RESUMEN .....	8
ABSTRACT .....	10
I. INTRODUCCIÓN .....	11
II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.....	12
2.1. CONCEPTO DEL HUEVO .....	12
2.2. EL HUEVO EN LA DIETA.....	12
2.3. COMPOSICIÓN DEL HUEVO.....	14
2.4. COMPOSICIÓN DEL CASCARÓN.....	15
2.4.1. EL CASCARÓN DEL HUEVO COMO FUENTE DE CALCIO.....	17
2.5. FUNCIÓN BIOLÓGICA DEL CALCIO.....	18
2.6. RELACIÓN CALCIO Y HUESO .....	19
2.7. HIDRÓLISIS ÁCIDA.....	20
2.7.1. Hidrólisis ácida en el cascaón.....	21
III. JUSTIFICACIÓN .....	23
3.1. HIPÓTESIS .....	24
3.2. OBJETIVOS.....	24
3.2.1. General .....	24
3.2.2. Específicos .....	24
IV. MATERIALES Y METODOS .....	25
4.1. EQUIPOS .....	25
4.2. REACTIVOS.....	25
4.3. HIDRÓLISIS DEL CASCARÓN.....	25
4.4. ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL DEL HIDROLIZADO DE CASCARÓN ...	27
4.5. ENSAYO BIOLÓGICO .....	28

4.5.1. Elaboración de la dieta .....	28
4.5.2. Distribución y manejo de los animales de experimentación.....	31
4.5.3. Sacrificio y obtención de las muestras biológicas .....	32
4.5.4 Caracterización de los huesos de las ratas .....	33
4.5.4.1. Prueba de dureza en los huesos .....	34
4.5.4.2. Determinación de Calcio por espectroscopia de absorción atómica. .....	35
4.5.4.3. Determinación cuantitativa de albúmina sérica .....	35
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	37
5.1. RENDIMIENTO DE LA HIDRÓLISIS DEL CASCARÓN .....	37
5.2. ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL DEL HIDROLIZADO DE CASCARÓN ...	38
5.3. ENSAYO BIOLÓGICO .....	39
5.3.1. Aceptación del alimento formulado .....	39
5.3.2. Ganancia de peso de los animales durante la prueba .....	40
5.3.3. Sacrificio y obtención de las muestras biológicas .....	45
5.3.4. Caracterización de los huesos de las ratas .....	46
5.3.4.1. Dimensiones físicas de los huesos.....	46
5.3.4.2. Prueba de dureza en los huesos .....	47
5.3.4.3. Determinación mineral por espectroscopia de absorción atómica..	50
5.3.4.4. Determinación cuantitativa de albúmina sérica .....	51
VI. CONCLUSIONES .....	53
VII. BIBLIOGRAFÍA .....	55
VI II. ANEXOS.....	59

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Lavado del cascarón previo a realizar la hidrólisis ácida.....	26
Figura 2. Trituración del cascarón con molino mecánico previo a realizar la hidrólisis ácida.....	26
Figura 3. Filtrados del cascarón con malla de cielo, proceso realizado después de llevar a cabo la hidrólisis ácida.....	27
Figura 4. Elaboración y formación de pellets de la dieta AIN-93G para ratas en crecimiento, en la cual se utilizó el cascarón producto de la hidrólisis ácida como fuente de calcio. ....	31
Figura 5. Distribución y manejo de los animales experimentales con base en la NOM-062-ZOO-1999.....	31
Figura 6. Distribución de los animales experimentales en jaulas diferentes según su sexo y con base en su grupo asignado para la administración de su dieta correspondiente (NOM-062-ZOO-1999).....	32
Figura 7. Sacrificio de los animales control (se les dio alimento comercial) y obtención de ambos fémures del ejemplar.....	33
Figura 8. Suero obtenido de cada una de las muestras de sangre tomada de los ejemplares.....	33
Figura 9. Medición de resistencia de los huesos con el texturómetro Brookfield (Brookfield ct3 texture analyzer).....	34
Figura 10. Determinación de albúmina sérica en sangre de cada uno de los ejemplares utilizados al terminar la prueba biológica. ....	36
Figura 11. Toma del peso de las ratas alimentadas con la dieta formulada (derecha) y con alimento comercial (izquierda) después de dos semanas del inicio de la prueba. ....	40
Figura 12. Sacrificio de los animales control (se les proporciono alimento comercial).....	45
Figura 13. Fémur fracturado, perteneciente al grupo de hembras alimentadas con la dieta formulada, donde se empleó en cascarón como fuente de Ca.....	48
Figura 14. ANOVA de ganancia de peso durante la primera semana de cada uno	

de los grupos. H y M (hembras y machos a los cuales se les dio alimento comercial), HP y MP (hembras y machos problema a los cuales se les dio alimento formulado)..... 61

Figura 15. ANOVA de ganancia de peso durante la segunda semana de cada uno de los grupos. H y M (hembras y Machos a los cuales se les dio alimento comercial), HP y MP (hembras y machos problema a los cuales se les dio alimento formulado). Column 1 (animales), ..... 59

Figura 16. ANOVA de ganancia de peso durante la tercera semana de cada uno de los grupos. H y M (hembras y Machos a los cuales se les dio alimento comercial), HP y MP (hembras y machos problema a los cuales se les dio alimento formulado).. ..... 60

Figura 17. ANOVA de ganancia de peso durante la cuarta semana de cada uno de los grupos. H y M (hembras y Machos a los cuales se les dio alimento comercial), HP y MP (hembras y machos problema a los cuales se les dio alimento formulado)..... 60

FIGURA 18. ANOVA de la longitud de los fémures de cada uno de los grupos. H y M (hembras y machos a los cuales se les dio alimento comercial), HP y MP (hembras y machos problema a los cuales se les dio alimento formulado).....61

FIGURA 19. ANOVA del espesor de los fémures de cada uno de los grupos. H y M (hembras y machos a los cuales se les dio alimento comercial), HP y MP (hembras y machos problema a los cuales se les dio alimento formulado).....61

FIGURA 20. ANOVA de los datos de albúmina sérica de cada grupo. H y M (hembras y machos a los cuales se les dio alimento comercial), HP y MP (hembras y machos problema a los cuales se les dio alimento formulado).....62

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Requerimiento diario de calcio, de acuerdo al NIH (National Institutes of Health).....	18
Tabla 2. Formulación general de la Dieta AIN-93G para ratas en crecimiento, reproducción, gestación y lactancia. ....	29
Tabla 3. Mezcla de minerales AIN-93G.....	29
Tabla 4. Mezcla de vitaminas AIN-93G.....	30
Tabla 5. Resultados del análisis proximal hecho al cascarón después de llevar a cabo la hidrólisis ácida. ....	38
Tabla 6. Tabla 6. Ganancia de peso por semana de cada uno de los grupos de los animales.....	40
Tabla 7. Cantidad de alimento consumido en gramos, en cada una de las semanas que se llevó a cabo el experimento. ....	43
Tabla 8. Longitud y espesor de los fémures de cada uno de los grupos. (n=4). ...	46
Tabla 9. Parámetros para la medición y fuerza requerida para fracturar los fémures de cada grupo.. ....	48
Tabla 10. Contenido de minerales presentes en los fémures de cada uno de los grupos. ....	50
Tabla 11. Contenido de albúmina sérica (g/dL) de cada grupo. ....	51

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

GRÁFICA 1. Análisis estadístico de la ganancia de peso durante la primera semana de cada uno de los grupos.....	41
Gráfica 2. Análisis estadístico de la ganancia de peso durante la segunda semana de cada uno de los grupos.....	41
Gráfica 3. Análisis estadístico de la ganancia de peso durante la tercera semana de cada uno de los grupos.....	42
Gráfica 4. Análisis estadístico de la ganancia de peso durante la cuarta semana de cada uno de los grupos.....	42
Gráfica 5. Longitud (L) y espesor (E) de los fémures de cada uno de los grupos.....	46
Gráfica 6. Comparación entre los resultados obtenidos de la fuerza requerida para la fractura de fémur.....	48
Gráfica 7. Comparación entre los datos obtenidos de albúmina sérica de cada grupo.....	52



## RESUMEN

Por un largo tiempo se han realizado múltiples investigaciones sobre el cascarón del huevo, por su alto contenido de minerales, tales como hierro, níquel, cobre, magnesio, potasio, y en su mayoría calcio, el cual está presente en forma de carbonato de calcio, haciendo difícil su solubilidad y biodisponibilidad. El objetivo de esta investigación consistió en realizar una conversión del carbonato de calcio presente en el cascarón, a acetato de calcio. Una vez llevada a cabo la hidrólisis ácida, se realizó un ensayo biológico, empleando 12 ratas Wistar, de 21 días de nacidas, las cuales se marcaron y dividieron en dos grupos, los cuales fueron alimentados desde el primer día con una dieta distinta, al grupo control se le dio alimento comercial (Nutricubos marca purina®), y al grupo problema se le dio un alimento formulado con base en la Dieta AIN-93G la cual está establecida para ratas en crecimiento (Reeves, 1997), en la cual se añadió el calcio obtenido de la hidrólisis ácida como fuente de calcio. Una vez completado el periodo de prueba, se sacrificaron cada uno de los ejemplares, se realizó la determinación de albúmina sérica con el fin de conocer el estado nutricional de los animales, los resultados obtenidos de albúmina sérica fueron, machos (M): 3.3549 g/dL, hembras (H): 3.4072 g/dL, machos prueba (MP):3.4933 g/dL y hembras prueba (HP): 3.5760 g/dL, dichos valores obtenidos se encuentran dentro de los valores considerados como normales. La cuantificación de minerales realizada en los fémures de los ejemplares, y fue realizada por espectroscopia de absorción atómica, siendo el calcio el minera de mayor importancia, los resultados de esta determinación fueron, machos (M): 29.1217 mg/L, hembras (H):28.3660 mg/L, machos prueba (MP): 28.4192 mg/L y hembras prueba (HP): 28.1370 mg/L, en esta determinación no se esperaba que la concentración de calcio fuera mayor en un grupo en comparación al otro, ya que solo se verificaría su absorción correcta . En conclusión, el hidrolizado del cascarón es apto para ser utilizado dentro de la dieta como fuente de calcio y/o suplemento alimentación.

**Palabras clave:**

1. **Minerales:** sustancia inorgánica existente en la corteza terrestre que está formada por uno o varios elementos químicos.
2. **Análisis proximal:** comprende la determinación de los porcentajes de humedad, grasa, fibra, cenizas, carbohidratos solubles y proteína en los alimentos.
3. **Formulación:** proceso empleado para el desarrollo y fabricación de un producto con especificaciones preestablecidas.
4. **Nutrientes:** sustancia que asegura la conservación y crecimiento de un organismo.
5. **Absorción:** acción de absorber.

## ABSTRACT

For a long time, multiple investigations have been carried out on the eggshell, due to its high content of minerals, such as iron, nickel, copper, magnesium, potassium, and mostly calcium, which is present in the form of calcium carbonate. , making its solubility and bioavailability difficult. The objective of this research was to carry out a conversion of the calcium carbonate present in the shell, a calcium acetate. Once the acid hydrolysis was carried out, a biological test was carried out, using 12 Wistar rats, 21 days old, which were marked and divided into two groups, which were fed from the first day with a different diet, at The control group was given commercial food (Purina® brand Nutricubos), and the problem group was given a food formulated based on the AIN-93G Diet which is established for growing rats (Reeves, 1997), in which added calcium obtained from acid hydrolysis as a source of calcium. Once the test period was completed, each of the specimens were sacrificed, the serum albumin determination was carried out in order to know the nutritional status of the animals, the results of serum albumin were, males (M): 3.3549 g / dL, females (H): 3.4072 g / dL, test males (MP): 3.4933 g / dL and test females (HP): 3.5760 g / dL, these values obtained are within the values considered normal. The quantification of minerals carried out in the femurs of the specimens, and was carried out by atomic absorption spectroscopy, with calcium being the most important mineral, the results of this determination were, males (M): 29.1217 mg / L, females (H): 28.3660 mg / L, test males (MP): 28.4192 mg / L and test females (HP): 28.1370 mg / L, in this determination the calcium concentration was not expected to be higher in one group compared to the other, since only its correct absorption would be verified. In conclusion, the shell hydrolyzate is suitable for use in the diet as a source of calcium and / or as a food supplement.

## I. INTRODUCCIÓN

El huevo es un alimento que debido a su fácil acceso ha tenido una gran aceptación por las poblaciones desde el inicio de la historia, a esto se debe que se preparen variedad de platillos con ellos y de diversas procedencias, siendo el huevo de gallina uno de los más preferidos por su fácil obtención y su rico sabor. El huevo constituye además una fuente rica en proteínas y minerales (Aburto, 2008).

Así mismo el cascarón es un componente del huevo, el cual no ha sido aprovechado adecuadamente, sin embargo, en los últimos años se han realizado más investigaciones, en las cuales se ha estudiado el aprovechamiento de sus componentes. La cáscara de huevo es rica en minerales como el carbonato de calcio (95% en peso de la corteza), carbonato de magnesio (1%) y fosfato de calcio (1%). Del carbonato de calcio presente en la cáscara, un 36.9% se encuentra de forma absorbible para el cuerpo humano, realizando una hidrólisis ácida, ayuda a elevar ese porcentaje de aprovechamiento (Bareto, 2008).

Definitivamente el calcio es un mineral indispensable para distintos procesos del organismo tales como la formación de los huesos y los dientes, la contracción muscular y el funcionamiento del sistema nervioso. El 95% del calcio de nuestro cuerpo se encuentra en los huesos y dientes y al no consumir este nutriente, estos se debilitan. Para los individuos cuyo consumo de alimentos ricos en calcio es limitado, el uso de la cáscara de huevo en alimentos, además de darle un valor agregado representa una alternativa para contribuir de forma significativa al requerimiento diario de calcio (Gómez, 2011).

El presente estudio tiene como objetivo utilizar el producto resultante de una hidrólisis ácida aplicada al cascarón, para posteriormente ser utilizado como fuente de calcio, incorporándolo a una dieta experimental (AIN-93G), y así probar su biodisponibilidad y absorción al ser suministrada en modelos biológicos (ratas de laboratorio Wistar).

## II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

### 2.1. CONCEPTO DEL HUEVO

De acuerdo con la NOM-159-SSA1-2016, los huevos son el producto de la ovulación de la gallina (*Gallus domesticus*) y otras especies de aves que sean aceptadas para consumo humano. (*NORMA Oficial Mexicana NOM-159-SSA1-2016, Productos y servicios. Huevo y sus productos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Método de prueba.*)

Los huevos de las aves constituyen un alimento habitual en la alimentación de los humanos. Se presentan protegidos por una cáscara y son ricos en proteínas (principalmente albúmina, que es la clara o parte blanca del huevo) y lípidos. Son un alimento de fácil digestión, componente principal de múltiples platos dulces y salados, y una parte imprescindible en muchos otros debido a su propiedad aglutinante (Aburto, 2008).

### 2.2. EL HUEVO EN LA DIETA

A nivel mundial, el huevo resulta ser uno de los alimentos más consumidos, con el fin de cubrir las necesidades proteicas de la población. Los factores que influyen en el consumidor al comprar un huevo, con respecto a otros alimentos son, el precio, el tamaño del huevo, la calidad y el sistema productivo (Bosch y Rodríguez, 2019).

Es por esto que el huevo es un alimento adecuado para una correcta alimentación humana ya que contiene una importante diversidad de nutrientes en cantidades equilibradas. El valor nutricional del huevo frente a otros alimentos proteicos de origen animal destaca por aportar vitamina E, vitamina A, vitamina D y hierro (Bosch y Rodríguez, 2019).

Con respecto a las proteínas, las glicoproteínas están presentes como la ovoalbúmina (54%), ovotransferrina (12%), ovomucoide (11%), ovomucina (1.5%), también se encuentran las globulinas (8%), la lisozima, la ovoflavoproteína y la avidina, son las que se encuentran en mayor proporción (Bosch y Rodríguez, 2019).

Las grasas del huevo aportan alrededor de 70 kcal y suponen la fuente de energía mayoritaria, ya que el huevo contiene 0.3 g de carbohidratos. Un huevo contiene alrededor de 4 g de grasa, de los cuales 1.8 g son ácidos grasos monoinsaturados (AGM), 1.4 g son ácidos grasos saturados (AGS) y 0.8 g son poliinsaturados (AGPI) (Bareto, 2008).

Así mismo el aporte de vitaminas del huevo supone entre el 15 y el 20% de las necesidades diarias del ser humano (Bareto, 2008).

Hay que mencionar, además que una ración de huevo aporta más de 15% de la cantidad recomendada de fósforo, hierro, zinc y selenio y de forma más general supone una fuente del 10% de los minerales necesarios diariamente en la dieta.

En los últimos años, algunos sectores de la población como son los deportistas, personas de bajos recursos, mujeres en estado de gestación o personas, buscan alternativas para cubrir su ingesta de calcio necesaria, ya que en muchos casos es necesario aumentar el consumo de este mineral. Por lo que en los últimos años se ha optado por consumir el cascarón como fuente de calcio, sabiendo que es rico en calcio, sin embargo, no existen estudios que avalen que esta práctica cumpla con su objetivo sin producir algún tipo de reacción secundaria o daño (Carbajal, 2006).

## 2.3. COMPOSICIÓN DEL HUEVO

Comienza a ser producido por las gallinas entre los 4 o 6 meses de vida, y durante un período de 2 a 3 años, con una frecuencia de 1 huevo por día; el huevo fresco y crudo con cáscara dura de 3 a 5 semanas, cuando las gallinas comienzan a poner huevos, es importante cambiar su alimentación, ya que comienza a requerir menos cantidad de proteínas, y más cantidad de calcio y algunos otros minerales (Bosch *et al*, 2019).

Por lo general los huevos suelen ser blancos o marrones, sin embargo, el color no interfiere en las propiedades y el sabor de huevo, ya que este último será producto de la alimentación del animal. El color es determinado por los pigmentos que impregnan al huevo mientras éste avanza por el oviducto de la gallina, por lo tanto, esto dependerá de la raza de la gallina (según el tipo de raza así será el color del huevo), por lo que será un factor genético.

Un huevo mediano de gallina suele pesar alrededor de 60 y 70 gramos, y el peso de cada uno de sus componentes es aproximadamente (Sevilla, 2015):

Yema (óvulo): es la parte central y anaranjada del huevo, supone de un 30% del peso total de huevo, y está constituida por múltiples capas de vitelo blanco y amarillo, un disco germinal, una membrana vitelina y látebra. Contiene las células germinales, donde se produce la fecundación y después el desarrollo embrionario. Esto es posible gracias a la gran riqueza de nutrientes de la yema. Con respecto a minerales, en la yema de huevo encontramos potasio, fósforo, hierro y calcio como protagonistas, aunque también ofrece pequeñas cantidades de magnesio, sodio y selenio, en cuanto a vitaminas, podemos encontrar ácido fólico en su gran mayoría, retinol o vitamina A y también contiene vitamina D, E, carotenos y colesterol.

Clara o albumen: supone un 59% aproximadamente del total del peso del huevo. Se compone de 4 capas que forman el llamado “saco albuminoideo”, cuya función es proteger a la yema: capa fina interior fluida, capa intermedia densa, capa gruesa fluida y capa fina exterior densa. La clara de huevo no contiene grasa, pero si

proteínas y minerales, tales como sodio y el potasio principalmente: algunas vitaminas, como el complejo B, se encuentran en pequeñas proporciones en la yema.

Membranas testáceas (interna y externa), cutícula, cámara de aire: juntas conforman el 2% de peso total del huevo. Son parte de las barreras defensivas del huevo contra la contaminación. La membrana interna es más fina que la externa.

Cutícula: Capa proteica de queratina que cierra los poros, aunque permite el intercambio gaseoso (salida de CO<sub>2</sub> y de vapor de agua y entrada de O<sub>2</sub>).

Cámara de aire: Espacio que se forma por contracción del albumen tras la puesta y fuerza la separación de las membranas. Aumenta con la edad del huevo, las pérdidas de CO<sub>2</sub> y de vapor de agua.

Cáscara: Supone un 9% del peso del huevo (Aburto, 2008).

## **2.4. COMPOSICIÓN DEL CASCARÓN**

La proporción de cáscara en un huevo es muy similar independientemente del tipo de ave, así mismo es la parte protectora del huevo como alimento, y al igual que cuando está fecundado, evita la contaminación del contenido, de manera que el huevo llegue al consumidor libre de bacterias, virus y otros patógenos presentes en el entorno (Rosas *et al*, 2018).

El color de la cáscara no interfiere en el sabor o composición del huevo, se debe a varios pigmentos, en especial a las ovoporfirinas, el cual será conferido por su origen genético, las razas tradicionales proceden de estirpes que ponen huevos con la cáscara blanca, así mismo suelen ser los más comunes de encontrar debido a que esta raza es de fácil adaptación. El origen de las gallinas que ponen huevos marrones es asiático y a lo largo del tiempo se han ido llevando a otras partes.

Así mismo, en la superficie, el huevo cuenta con numerosos poros (entre 7.000 y 15.000) que forman túneles entre los cristales minerales y que le permiten cumplir



un importante papel en el intercambio gaseoso y el equilibrio en humedad entre el interior y el medio externo (Santana, 2018).

La cáscara tiene un grosor medio de 0.35 mm y está formada por 5 capas (Pérez *et al.*, 2016):

1) La parte más interna son dos membranas de fibras proteicas, las membranas testáceas, que actúan como filtros impidiendo la entrada de microorganismos del exterior y controlan la difusión del albumen y por tanto la evaporación rápida de fluidos internos del huevo. Cada fibra de las membranas testáceas posee un núcleo proteico, rodeado por una cubierta de hidratos de carbono, sobre las que se depositarán las sales de calcio provenientes del oviducto.

2) La parte mineral de la cáscara se ancla a la siguiente capa de la cáscara.

3) La membrana mamilar mediante los núcleos mamilares que son el origen de los conos invertidos.

4) La unión de estos conos o columnas poligonales forma la capa empalizada, se trata de una capa compacta compuesta de cristales rombohédricos de calcita.

5) La capa más externa es la cutícula, cubre todas las estructuras, incluidas las aperturas de los poros, su función es evitar las pérdidas de agua y la contaminación bacteriana. Se compone principalmente de proteínas como la queratina, mucopolisacáridos, lípidos y pigmentos, en el caso de los huevos de color. La cutícula es secretada inmediatamente antes de la puesta y es la primera barrera de defensa que poseen los huevos. Esta última capa confiere al huevo un aspecto brillante, pero se deteriora entre los 2 y 4 días después de la puesta y si se lava o se frota el huevo, la cutícula desaparece.

Dicho brevemente la cáscara del huevo está compuesta por 1.6% de agua, de 3.3 a 3.5% de materia orgánica y 95% de materia mineral. La parte mineral es en un 94% carbonato cálcico (del cual 37.5% es calcio y 58% carbonato), en el 6% restante se ha encontrado magnesio, fósforo y manganeso, pero también se puede encontrar sodio, cinc, hierro, cobre y aluminio.

## 2.4.1. EL CASCARÓN DEL HUEVO COMO FUENTE DE CALCIO

El calcio es el componente de mayor proporción presente en el cascarón, el cual se encuentra en forma carbonato de calcio en el huevo; el carbonato de calcio es usado como suplemento alimenticio, cuando la cantidad de calcio consumida no es suficiente. Sin embargo, el consumo de carbonato de calcio como suplemento alimenticio se ve frenada debido a los efectos secundarios que este puede ocasionar por una ingesta prolongada, como: dolor de cabeza, mareos, náuseas, vómito, aumento en la necesidad de orinar, sensación de sabor metálico, entre otras (Rosas *et al*, 2018).

El calcio es de mucha importancia, ya que, al ser extraído, reconcentrado, bioactivado e ionizado cumple muchas funciones fisiológicas y metabólicas de alta importancia en todos los órganos vivos (Restrepo-Giraldo *et al*, 2015).

Algunos ejemplos de alimentos ricos en calcio son los siguientes (Valdés, 2009):

Lácteos: leche, queso yogur, mantequilla, etc.

Pescados y mariscos: sardinas, salmón, almejas y berberechos.

Hortalizas: espinacas, col rizada y berros.

Frutos secos y legumbres: soja, garbanzos, almendras e higo seco.

Cuando el calcio que obtenido de la dieta diaria es insuficiente, se optara por la ingesta de un suplemento alimenticio. La cantidad de calcio que necita consumir diariamente dependerá de la edad del individuo. La demanda de calcio con respecto a la edad se muestra en la Tabla 1.

<b>Etapa de la vida</b>	<b>Cantidad recomendada</b>
Bebés hasta los 6 meses de edad	200 mg
Bebés de 7 a 12 meses de edad	260 mg
Niños de 1 a 3 años de edad	700 mg
Niños de 4 a 8 años de edad	1,000 mg
Niños de 9 a 13 años de edad	1,300 mg
Adolescentes de 14 a 18 años de edad	1,300 mg
Adultos de 19 a 50 años de edad	1,000 mg
Hombres adultos de 51 a 70 años de edad	1,000 mg
Mujeres adultas de 51 a 70 años de edad	1,200 mg
Adultos de 71 o más años de edad	1,200 mg
Adolescentes embarazadas o en periodo de lactancia	1,300 mg
Mujeres adultas embarazadas o en periodo de lactancia	1,000 mg

Tabla 1. Requerimiento diario de calcio, de acuerdo al NIH (National Institutes of Health) 2019.

## 2.5. FUNCIÓN BIOLÓGICA DEL CALCIO

Es el catión divalente más abundante en el organismo humano, del que constituye de 1,5 a 2 % del peso total. Más de 99% del calcio del organismo se encuentra en el esqueleto. Todos los seres vivos poseen poderosos mecanismos capaces de conservar el calcio y mantener constantes sus concentraciones en las células y en los líquidos extracelulares (Sánchez *et a*, 2002).

Las funciones fisiológicas desarrolladas por el calcio son tan importantes para la supervivencia que, en caso de deficiencia dietética grave o de pérdidas anormales, estos mismos mecanismos llegan a desmineralizar el hueso para evitar grados incluso menores de hipocalcemia. El hueso proporciona una fuente vital y fácilmente accesible de calcio para el mantenimiento de las concentraciones normales en el líquido extracelular, en donde cerca de 50% se encuentra ionizado y fisiológicamente activo (Sánchez *et a*, 2002).

El calcio (Ca) es un componente muy importante a nivel biológico. Es responsable junto con otros elementos de diferentes funciones estructurales en el esqueleto, tejidos blandos, y de funciones reguladoras como (Mendoza *et al*, 2016):

- La transmisión neuromuscular de los estímulos químicos y eléctricos.
- La secreción celular.
- La coagulación de la sangre.
- El transporte de oxígeno.
- La actividad enzimática.

Así mismo el (Ca) es un micronutriente del grupo de los minerales que debe, siempre, formar parte de nuestra dieta. Es el elemento mineral más abundante en nuestro organismo, ya que forma parte importante del esqueleto y los dientes. Supone alrededor del 2% del peso corporal; en cifras absolutas, aproximadamente 1.200 g (1,2 kg). De todo el calcio corporal, el 99% se encuentra en el esqueleto y los dientes en forma de hidroxapatita, un compuesto cristalino que incluye fósforo. El resto (1%) se encuentra en los tejidos blandos y en los fluidos corporales (Mendoza *et al*, 2016).

Cuando se presenta una deficiencia de calcio, se suelen presentar una serie de síntomas, lo cuales por lo general son: debilidad ósea, dientes débiles, calambres musculares, insomnio, presión arterial alta, dolores menstruales, dificultad para perder peso, piel seca, uñas débiles y trastornos capilares (NIH, 2009).

## **2.6. RELACIÓN CALCIO Y HUESO**

El calcio es un mineral el cual se encuentra en mayor proporción en los huesos, por lo cual, es de vital importancia tener una alimentación adecuada. Una ingesta de calcio adecuada, a nivel de tejido óseo, ayuda al crecimiento y fortalecimiento de cada uno de los huesos, en cambio si la ingesta de calcio es muy baja, es común

presentar problemas, entre los cuales se destaca un mayor riesgo a sufrir algún tipo de fractura (Maya, 2009).

Las fracturas son una discontinuidad en los huesos, a consecuencia de golpes, fuerzas o tracciones cuyas intensidades superen la elasticidad del hueso, en su mayoría son provocadas cuando a un hueso se le aplica presión con demasiada fuerza, más de la que puede soportar (Maya, 2009).

La susceptibilidad que tendrá un hueso a sufrir una fractura dependerá de la cantidad de calcio que este contenga, una cantidad adecuada de calcio ayudara a que nuestro hueso tenga las dimensiones adecuadas y la fuerza requerida para causar una fractura será mayor, en comparación a un hueso que no contenga los niveles adecuados de calcio, ya que este crecerá de una manera más lenta y será más débil (Maya, 2009).

## **2.7. HIDRÓLISIS ÁCIDA**

La palabra hidrólisis, se refiere a la destrucción, descomposición o alteración que sufre una determinada sustancia química por el agua. Cuando se estudian soluciones acuosas de electrólitos, el término es aplicado a las reacciones de los cationes con el agua para producir una base débil, o en otros casos, a la de los aniones para originar un ácido débil. Es importante mencionar que el grado de hidrólisis es la fracción del ion que reacciona con el agua. Es la descomposición química que se produce en las sustancias por el agua, el cual depende de la química, la solubilidad, el pH y el potencial de oxidación-reducción o redox que tenga un determinado compuesto (Pérez y Aguirre, 2019).

Existen básicamente cuatro tipos diferentes de hidrólisis, que son las siguientes (Martínez, 2016):

1. Hidrólisis de sal de ácido fuerte-base fuerte. En este caso no se produce casi hidrólisis, al no ser los cationes y aniones muy reactivos, dado que son débiles. El pH en este caso será neutro.

2. Hidrólisis de sal de ácido débil-base fuerte. Aquí la debilidad del ácido (y por ende del anión) genera iones hidroxilo, mientras que el catión, siendo fuerte, no reaccionará. El pH resultante será básico.

3. Hidrólisis de sal de ácido fuerte-base débil. Caso contrario al anterior, la debilidad de la base (y por ende del catión) generará iones hidronio (hidroxonio), mientras que los aniones no reaccionarán. El pH resultante será ácido.

4. Hidrólisis de sal de ácido débil-base débil. La alta reactividad de tanto los cationes como los aniones, por lo que habrá un equilibrio mayor o menor en la reacción y se producirán tanto iones hidroxilos como hidronios. El pH de esta reacción será neutro (Martínez, 2016).

La hidrólisis implica la reacción de un producto químico orgánico utilizando el agua para poder formar dos o más sustancias nuevas, dicho en otras palabras, la hidrólisis por lo general significa la división de enlaces químicos por medio de la adición de agua (Sánchez *et al*, 2002).

Así mismo en la hidrólisis ácida el agua puede encontrarse actuando como un ácido o una base, basándonos en la teoría del ácido de Brønsted-Lowry. Es un proceso por medio del cual un ácido prótico es utilizado para poder catalizar la escisión que tiene un enlace químico por medio de una reacción de sustitución nucleófila añadiendo agua (Sánchez *et al*, 2002).

### 2.7.1. HIDRÓLISIS ÁCIDA EN EL CASCARÓN

Al realizar este proceso con el cascarón, empleando ácido acético, se logra la desintegración del carbonato de calcio (Gómez, 2011).

Por lo cual la cáscara desaparece porque está compuesta por carbonato cálcico, que reacciona con el ácido acético del vinagre, según la siguiente reacción (Gómez, 2011):



Así mismo el vinagre proporciona un pH ácido con una elevada concentración de  $\text{H}_3\text{O}^+$ , que reaccionan con los  $\text{OH}^-$ , favoreciendo que los equilibrios de hidrólisis se desplacen hacia la derecha, por lo que el equilibrio de solubilidad también se desplaza hacia la derecha. En consecuencia, una disminución del pH provoca un aumento de la solubilidad del  $\text{CaCO}_3$ , además, el ácido carbónico se descompone en dióxido de carbono y agua (Gómez, 2011).

Al liberarse el  $\text{CO}_2$ , se observa la formación de burbujas, el equilibrio se desplaza hacia la derecha aumentando la solubilidad de la sal (Gómez, 2011).

### III. JUSTIFICACIÓN

El presente trabajo es una propuesta que permitirá reducir los desechos de cascarón, dándoles una utilidad, al ser empleados para la obtención de calcio, llevado a cabo mediante la implementación de un método económico y sencillo, el cual pueda llevarlo a cabo cualquier persona.

El calcio es un mineral indispensable para varios procesos del organismo tales como la formación de los huesos y los dientes, la contracción muscular y el funcionamiento del sistema nervioso. También, ayuda en la coagulación de la sangre y en la actividad de algunas enzimas. El 95% del calcio de nuestro cuerpo se encuentra en los huesos y dientes.

Cuando una persona consume muy poco calcio, los huesos y los dientes se debilitan. En el caso del niño o la niña, el crecimiento se atrasa y, si la situación se mantiene durante un período considerable, el crecimiento de los huesos se detiene, y en lugar de ser rígidos, se hacen más blandos y pueden causar cambios en la forma de las piernas y del tórax. En personas adultas, y sobre todo en la mujer, el consumo adecuado de calcio es muy importante para evitar que los huesos se vuelvan porosos y quebradizos. Cuando esto ocurre, la persona tiene osteoporosis.

Los beneficios de obtener calcio mediante el carbonato de calcio presente en la cáscara del huevo, no solo están centrados en lograr obtener un suplemento de calcio de una manera económica, sino también haciéndolo de forma ecológica, al utilizar como materia prima el cascarón del huevo, ya que la mayoría de las veces este producto es considerado como un desecho.

La presente investigación tiene como objetivo la obtención de calcio mediante la disociación del carbonato de calcio presente en el cascarón del huevo, y posteriormente probar su biodisponibilidad y absorción al ser empleado como fuente de calcio en modelos biológicos. Para cumplir con esto se plantea un proceso factible para la obtención de calcio utilizando residuos de cáscara de huevo.



### **3.1. HIPÓTESIS**

La sal soluble obtenida de la hidrólisis ácida del cascarón de huevo es una fuente de calcio biodisponible, para su empleo en alimentación.

### **3.2. OBJETIVOS**

#### **3.2.1. General**

Obtener calcio del cascarón del huevo de gallina y verificar su biodisponibilidad mediante un ensayo biológico.

#### **3.2.2. Específicos**

- Convertir carbonato de calcio, a acetato calcio, mediante una hidrólisis ácida.
- Caracterizar el hidrolizado de cascarón.
- Determinar el calcio presente en el hidrolizado del cascarón por medio de espectroscopia de absorción atómica.
- Analizar la biodisponibilidad del calcio presente en el hidrolizado del cascarón mediante un ensayo biológico.
- Determinar la cantidad de calcio y otros minerales (Fe, Ni, Cu, Mg, k, Na) presente en el material óseo de los animales de experimentación, por medio de espectroscopia de absorción atómica.

## **IV. MATERIALES Y METODOS**

### **4.1. EQUIPOS**

Los equipos que se utilizaron en la investigación son los siguientes:

- Vernier Mitutoyo.
- Balanza Analítica 0.0001 g de precisión marca Ohaus.
- Texture Analyzer Brookfield CT3.
- Cuchilla TA7.
- Bomba de vacío SIEMENS, modelo: IRF3 052-4YC31.
- Balanza Analítica Digital. Marca Precisa. Capacidad 220g. Modelo XT220A.
- Balanza Granataría Marca Ohaus®. Capacidad 2,610g. Modelo Triple Beam Balance TJ2611.
- Desecador. Marca Nalgene. Modelo: 150MM.
- Equipo Kjeldahl.
- Equipo Soxhlet.
- Espectrofotómetro de absorción atómica: AAnalyst 200UV/Vis.
- Licuadora Osterizer.
- Mufla marca FELISA Modelo: FE-363.

### **4.2. REACTIVOS**

Los reactivos para cada análisis químico se prepararon y verificaron de acuerdo a las especificaciones de cada método. La marca usada para los reactivos son J. L. Baker.

### **4.3. HIDRÓLISIS DEL CASCARÓN**

Como primer paso se realizó una limpieza para eliminar todas las impurezas que este pueda tener adheridas el cascarón, como lo son: polvo, lodo y residuos fecales del animal (Figura 1), posteriormente se hirvió a una temperatura de 95 °C por aproximadamente 1 hora para eliminar todas las bacterias que este pudiese contener, y se colocó en una manta bajo el sol. Una vez seco en su totalidad, se trituró con ayuda de un molino mecánico (Figura 2).



**Figura 1. Lavado del cascarón previo a realizar la hidrólisis ácida.**



**Figura 2. Trituración del cascarón con molino mecánico previo a realizar la hidrólisis ácida.**

Se utilizó una proporción 3:1 (ácido acético:cascarón). Se pesó 200 g de cascarón triturado, se colocó en un recipiente y se le añadió 600 mL de ácido acético, el cual fue medido con una probeta. La mezcla se dejó reposar durante 24 horas a temperatura ambiente, posteriormente se realizó un filtrado con ayuda de una manta de cielo, este proceso se realizó decantando lentamente el sobrenadante, por último se realizó un lavado del filtrado, utilizando agua pura hasta que saliera lo más clara posible.



**Figura 3. Filtrados del cascarón con malla de cielo, proceso realizado después de llevar a cabo la hidrólisis ácida.**

Una vez terminado el proceso, y sin retirar el filtrado, se colocó la manta de cielo dentro de un deshidratador solar, esto para eliminar la humedad presente en la muestra.

#### **4.4. ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL DEL HIDROLIZADO DE CASCARÓN**

Una vez efectuada la digestión ácida del cascarón, se realizó un análisis proximal. Las pruebas realizadas fueron las siguientes:

Para realizar la determinación de Humedad se utilizó el método 934.01 de la AOAC (1990) y con base en la NOM-116-SSA1-1994. La determinación de humedad puede ser el análisis más importante llevado a cabo en un producto alimentario, ya que al eliminar la humedad presente en la muestra ayudara en las determinaciones posteriores.

Para llevar a cabo la determinación de cenizas se empleó el método 962.02 de la AOAC (1990), y con base en la NMX-F-607-NORMEX-2013.

La determinación de proteína se realizó por el método 32.1.22 de la AOAC (1990), y con base en la NMX-F-608-NORMEX-2011.

Para la determinación de lípidos, se utilizó el método 30.10 de la AOAC (1990) y con base en la NMX-F-615-NORMEX-2018.

Para la determinación de minerales, se colocó 1 g de la muestra en un tubo de ensaye, posteriormente se añadieron 15 mL de ácido nítrico, y se dejó a una temperatura de 26 °C aproximadamente hasta que la muestra estuviera clarificada, eliminando así toda la materia orgánica, por último, se filtró utilizando un papel de 5 micras y se aforó a 100 mL con agua desionizada. Por medio de espectroscopia de absorción atómica se cuantificó la cantidad de minerales presentes en la muestra.

De igual manera se le realizó una prueba de acidez para comprobar que la muestra no haya sido afectada por la hidrólisis ácida, llevándose a cabo una titulación con NaOH al 0.1 N, las alícuotas fueron preparadas con agua desionizada, esto para no afectar el pH de la muestra, y se utilizó como indicador fenolftaleína.

Cada una de las determinaciones mencionadas anteriormente fueron realizadas por triplicado, a los resultados obtenidos se calculó un promedio, siendo ese el resultado final.

## **4.5. ENSAYO BIOLÓGICO**

### **4.5.1. Elaboración de la dieta**

Una vez realizada la hidrólisis ácida del cascarón y tomando en cuenta su composición química, se realizó la formulación del alimento que se utilizaría para llevar a cabo el análisis biológico, con base en la Dieta AIN-93G la cual está establecida para ratas en crecimiento (Reeves, 1997) los datos tomados en cuenta para la formulación de la dieta se observan en la tabla 2. Como fuente de calcio se utilizó el cascarón.

Formulación general de la Dieta AIN-93G para ratas en crecimiento, reproducción, gestación y lactancia.

<b>Ingredientes</b>	<b>g/Kg de dieta</b>
Caseína (>85% de Nitrógeno)	200
Almidón	397.48
Almidón dextrinizado	132
Sacarosa	100
Celulosa	50
Aceite de frijol de soya	70
Mezcla de minerales AIN-93G (libre de Calcio)	35
Mezcla de vitaminas AIN-93G	10
L-Cistina	3
Bitartrato de Colina	2.5
Ter-butilhidroquinona (TBHQ) mg	14

Fuente: Reeves (1997).

**Tabla 2. Formulación general de la Dieta AIN-93G para ratas en crecimiento, reproducción, gestación y lactancia.**

Mezcla de minerales AIN-93G.

<b>Ingredientes</b>	<b>g/kg de mezcla</b>
Hidrolizado de cascarón	16.868
Fosfato de Potasio (monobásico)	196.00
Citrato de potasio H <sub>2</sub> O	70.78
Cloruro de sodio	74.00
Sulfato de potasio	46.60
Óxido de magnesio	24.00
Citrato férrico, U.S.P.	6.06
Carbonato de zinc	1.65
Carbonato de manganeso	0.63
Carbonato de cobre	0.30
Yodato de potasio	0.01
Selenato de sodio	0.01025
Paramolibdato de amonio 4H <sub>2</sub> O	0.00795
Metasilicato de sodio 9H <sub>2</sub> O	1.45
Cloruro de litio	0.0174
Ácido bórico	0.0815
Fluoruro de sodio	0.0635
Carbonato de níquel	0.0318
Sacarosa (polvo fino)	221.026

Fuente: Reeves, (1997).

**Tabla 3. Mezcla de minerales AIN-93G.**

### Mezcla de vitaminas AIN-93G.

<b>Ingredientes</b>	<b>g/kg de mezcla</b>
Niacina	3.00
Pantotenato de calcio	1.60
Piridoxina HCl	0.70
Tiamina HCl	0.60
Riboflavina	0.60
Ácido fólico	0.20
Biotina	0.02
Vitamina E acetato (500 IU/g)	15.00
Vitamina B12 (0.1%)	2.50
Vitamina A palmitato (500,000 IU/g)	0.80
Vitamina D3 (400,000 IU/g)	0.25
Vitamina K1/dextrosa mezcla (10 mg/g)	7.50
Sacarosa	967.23

Fuente: Reeves, (1997).

**Tabla 4. Mezcla de vitaminas AIN-93G.**

Para llevar a cabo la preparación del alimento experimental, como primer paso se realizó la homogenización de todos los componentes sólidos, posteriormente y con ayuda de una bureta, fue añadido el aceite de forma lenta y con movimientos constantes, esto para incorporarlo de una manera homogénea. Se añadieron 50 mL de agua pura, esto para ayudar a tener una textura adecuada, y realizar la formación de pequeños pellets. Este último paso ayudó a que el alimento tuviera una mejor aceptación por parte de los animales experimentales. Una vez terminada la formación de los pellets, fueron colocados en un deshidratador solar, para eliminar la mayor cantidad de agua y de la misma forma tener una mejor textura y apariencia. El alimento fue sellado y guardado dentro de una bolsa, y conservado a temperatura ambiente hasta su uso.



**Figura 4. Elaboración y formación de pellets de la dieta AIN-93G para ratas en crecimiento, en la cual se utilizó el cascarón producto de la hidrólisis ácida como fuente de calcio.**

#### 4.5.2. Distribución y manejo de los animales de experimentación

Para el experimento, se utilizaron ratas macho y hembra Wistar de 21 días de nacidas, las cuales se marcaron y dividieron en dos grupos. El primer grupo, denominado control, estaba conformado por un total de 3 machos y 3 hembras, con un peso de 48-51 g, el segundo grupo, denominado problema, se conformó por 4 machos y 2 hembras, con un peso de 35-40 g. En ambos casos los animales fueron separados por sexo, en una jaula se colocaron las hembras y en otra los machos y cada uno de los animales fueron marcado utilizando en método de manchado (NOM-062-ZOO-1999).



**Figura 5. Distribución y manejo de los animales experimentales con base en la NOM-062-ZOO-1999.**



Ambos grupos fueron alimentados desde el primer día con el alimento asignado a cada uno, el grupo control con alimento comercial (Nutricubos marca Purina®), y el grupo problema con alimento formulado. Las condiciones ambientales que se manejaron fueron, 12 horas de luz artificial y 12 horas de oscuridad, aisladas de ruidos, a una temperatura de 22°C. Ambos grupos se alimentaron por un periodo de 28 días, durante este periodo, se llevó un registro de su peso corporal desde el día uno del experimento y hasta el final, con intervalos de 7 días, de la misma forma se llevó un control de la cantidad de alimento consumido, por grupo, con intervalos de un día a lo largo de toda la experimentación.



**Figura 6. Distribución de los animales experimentales en jaulas diferentes según su sexo y con base en su grupo asignado para la suministración de su dieta correspondiente (NOM-062-ZOO-1999).**

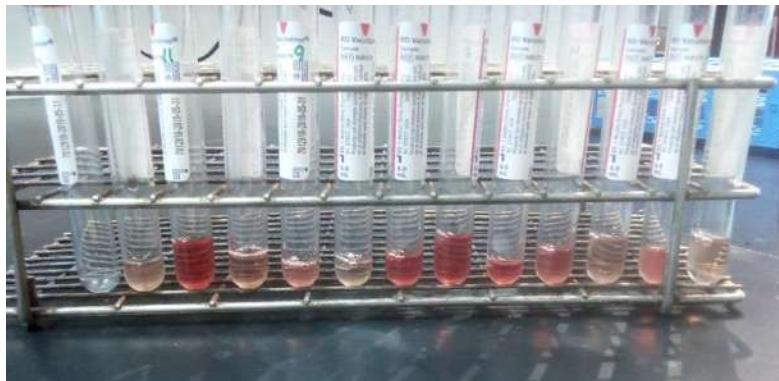
#### 4.5.3. Sacrificio y obtención de las muestras biológicas

La experimentación se llevó a cabo por un periodo de 28 días, al término de este mismo se les retiró el agua y el alimento una noche antes de su sacrificio, esto para evitar que la determinación de albúmina sérica pueda verse afectada. El sacrificio de los animales se realizó mediante una dislocación cervical y con base en la NOM-033-SAG/ZOO-2014. Este método suele ser utilizado cuando se trata de roedores pequeños. El procedimiento empleado consiste en colocar el pulgar e índice a cada lado del cuello, junto a la base del cráneo y en ese momento con la otra mano, se tira rápidamente de la base de la cola, separando las vértebras cervicales y el cráneo.



**Figura 7. Sacrificio de los animales control (se les dio alimento comercial) y obtención de ambos fémures del ejemplar.**

De igual manera se tomó una muestra de sangre a cada animal por punción cardiaca, al igual que ambos fémures. La muestra de sangre se centrifugó a 3500 rpm para separar el suero y posteriormente analizarlo. En el caso de los fémures obtenidos, con ayuda de un bisturí se retiró completamente el tejido muscular y se colocaron en a una incubadora para eliminar la humedad, para posteriormente ser caracterizados físicamente.



**Figura 8. Suero obtenido de cada una de las muestras de sangre tomada de los ejemplares.**

#### 4.5.4 Caracterización de los huesos de las ratas

A cada par de huesos obtenidos de cada una de las ratas, se les realizó las mediciones de: longitud, espesor y diámetro, estas determinaciones fueron realizadas con un Vernier (Luna, 2015).

#### 4.5.4.1. Prueba de dureza en los huesos

Para determinar la fuerza requerida para fracturar cada fémur de los ejemplares, se usó un texturómetro marca Brookfield (Brookfield ct3 texture analyzer). En esta prueba se usó una cuchilla TA7 de kit general.

La fuerza ejercida para causar la fractura se hizo justo en la parte media de hueso, tomando como referencia la longitud de este.

La determinación de dureza de los huesos, es una prueba que ayuda a conocer la fuerza necesaria que se requiere para causar una fractura. Uno de los factores que influyen para que un hueso sea más fuerte, es la cantidad de calcio y otros minerales que este contenga, es decir, si el hueso tiene una concentración adecuada de minerales, la fuerza necesaria para causar una fractura será mayor.

En esta prueba se usó una cuchilla TA7 de kit general, la cual se conectó al brazo del equipo. Para provocar la fractura del hueso, la cuchilla se desplazó a una velocidad de 1 mm/s, con una fuerza de 0.1 kg y una profundidad de 10 mm. La prueba se realizó a cada fémur, reportando la fuerza empleada para fracturar el hueso.



**Figura 9. Medición de resistencia de los huesos con el texturómetro Brookfield (Brookfield ct3 texture analyzer).**

#### 4.5.4.2. Determinación de Calcio por espectroscopia de absorción atómica.

Para llevar a cabo la determinación de la cantidad de Ca y otros minerales (Fe, Ni, Cu, Cd, Mg, k, Na) que se absorbieron durante los 28 días que duró la prueba, se hizo por medio de espectroscopia de absorción atómica.

Una vez que se tenía el fémur de cada uno los animales, se trituraron cada una de las muestras con ayuda de un mortero, y se pesaron aproximadamente 0.5 g de cada muestra y se colocaron en tubos, a los cuales se les agregó 20 mL de ácido nítrico, y se dejaron en una estufa eléctrica a una temperatura aproximada de 25 °C hasta que las muestra se clarificara. Posteriormente se filtró en un papel de 5 micras y se realizaron lavados al tubo con agua desionizada, para después aforar en un matraz a 100 mL, igualmente con agua desionizada.

Después se cuantificó la cantidad de minerales presentes en la muestra, por medio de espectroscopia de absorción atómica. Los límites de detección tomados en cuenta para dicha determinación fueron: Ca 0.062 mg/L, Fe 0.04 mg/L, Ni 0.06 mg/L, Cu 0.025 mg/L, Cd 0.01 mg/L, Mg 0.004 mg/L, K 0.02 mg/L, Na 0.007 mg/L.

#### 4.5.4.3. Determinación cuantitativa de albúmina sérica

La albúmina, es una proteína que se encuentra en gran proporción en el plasma sanguíneo, siendo la principal proteína de la sangre, y una de las abundantes en el ser humano. Se sintetiza en el hígado (Cordero *et al*, 2016).

La concentración normal en la sangre humana oscila entre 3.5 y 5.0 gramos por decilitro, y supone un 54.31% de la proteína plasmática, el resto de proteínas presentes en el plasma se llaman en conjunto globulinas. La albúmina es fundamental para el mantenimiento de la presión osmótica, necesaria para la distribución correcta de los líquidos corporales entre el compartimento intravascular y el extravascular, localizado entre los tejidos, también efectúa el transporte de

hormonas tiroideas, hormonas liposolubles, ácidos grasos libres, bilirrubina conjugada y control de pH (Cordero *et al*, 2016).

La prueba se llevó a cabo empleando un kit para albúmina Verde de bromocresol marca Sprinreact®. El fundamento de esta prueba consiste en la combinación de la albúmina con el verde de bromocresol a pH ligeramente ácido, provocando un cambio de color del indicador, de amarillo a verde azulado, dependiendo de la concentración de la albúmina presente en la muestra. Las condiciones en las que la prueba se llevó a cabo fueron: longitud de onda 630 nm a una temperatura de 36 °C



**Figura 10. Determinación de albúmina sérica en sangre de cada uno de los ejemplares utilizados al terminar la prueba biológica.**

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una de las fuentes más importantes de calcio que hay en el huevo, es el cascarón, sin embargo, no ha sido aprovechado en su totalidad. Es importante saber que, el calcio que contiene el cascarón viene en forma de carbonato de calcio, haciendo difícil su biodisponibilidad, debido a su nula solubilidad.

La hidrólisis ácida es un proceso el cual, al emplear ácido acético ayuda a la desintegración del carbonato de calcio, convirtiéndolo a calcio soluble y biodisponible.

La realización de este trabajo comprueba la biodisponibilidad del calcio obtenido del cascarón mediante una hidrólisis ácida, este proceso garantiza la transformación del carbonato de calcio, a acetato de calcio, para poder ser utilizado como fuente de calcio.

### 5.1. RENDIMIENTO DE LA HIDRÓLISIS DEL CASCARÓN

El motivo por el cual se llevó a cabo la hidrólisis ácida, empleando ácido acético, se debe a la cantidad de calcio que se logra obtener mediante este proceso, teniendo un rendimiento de un 32.3% por cada 100 gramos de cascarón triturado. Dicho valor es superior en un 22.07% al obtenido por Gómez (2011) siendo de 26.46% por cada 99 gramos de cascarón triturado, de igual manera se menciona que, el rendimiento más alto se obtiene al realizar la hidrólisis ácida empleando ácido acético en comparación a otras sustancias como lo son: jugo de limón, leche, jugo de naranja y agua hervida, donde el rendimiento se encuentra por debajo del 19.20% por cada 99 gramos de cascarón triturado.

## 5.2. ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL DEL HIDROLIZADO DE CASCARÓN

En la Tabla 5 se presentan los resultados obtenidos del análisis proximal realizado al hidrolizado de cascarón.

Muestra	Resultados
Humedad	3.61%
Extracto etéreo	2.19%
Cenizas	35.17%
Proteína	20.98%
Calcio	4235.10 mg/kg

**Tabla 5. Resultados del análisis químico proximal del hidrolizado del cascarón.**

El resultado obtenido de humedad fue de 3.61%, en comparación al valor reportado por Urbano (2015), se puede apreciar una ligera diferencia, siendo de 1.29% su valor reportado, esto se debe a la hidrólisis ácida realizada antes de llevar a cabo el análisis proximal, ya que durante este procedimiento el producto absorbió un poco más de humedad; con respecto a extracto etéreo, el resultado obtenido fue de 2.19%, dicho valor es superior en una 54.22% al resultado obtenido por Urbano (2015) el cual fue de 1.42%, ambos valores resultan ser bajos debido a la baja cantidad de lípidos que contiene el cascarón en su estructura.

El valor obtenido de proteína fue de 20.98%, en comparación a los resultados reportados por Urbano (2015) se puede apreciar una diferencia significativa, siendo de 3.33% su valor reportado, esto se debe a la cantidad de membrana adherida al cascarón una vez llevada a cabo dicha determinación, debido a que la membrana está compuesta principalmente por distintos tipos de proteína. En la metodología usada por Urbano (2015), se menciona que la membrana fue retirada del cascarón empleando una solución ácida y posteriormente una solución básica, garantizando

de esta manera la eliminación total de la membra adherida al cascarón, por otro lado, durante este ensayo la eliminación de la membrana adherida al cascarón se hizo de forma manual, por ende, no existía la certeza que el cascarón no tuviera membrana adherida al llevar a cabo dicha determinación.

En cuanto a cenizas, el valor obtenido fue de 35.17%, en comparación a los valores reportados por Urbano (2015) se puede apreciar una diferencia significativa, siendo de 94.62%, esto se debe a que su muestra no recibió un tratamiento previo para eliminar la cantidad de carbonatos presentes dentro de ella, en el caso de la muestra utilizada para la elaboración de este trabajo, la eliminación de los carbonatos se realizó mediante la hidrólisis ácida aplicada.

### **5.3. ENSAYO BIOLÓGICO**

#### **5.3.1. Aceptación del alimento formulado**

Este parámetro se determinó mediante una prueba hedónica, en la cual se evaluaron las características que presentaban, tanto el alimento comercial como el alimento que fue elaborado. En cuanto a color, resultan ser muy distintos uno del otro, debido a los componentes que se utilizan para la fabricación de cada uno, sin embargo, este parámetro no influyó en la aceptación del alimento por parte de los animales, respecto a la textura, se pudo observar que ambos grupos son muy semejantes, ya que ninguno de los animales presentaba ninguna dificultad a la hora de consumir el alimento, en cuanto a forma, el alimento comercial tenía un aspecto más uniforme, debido al proceso que se realiza para su fabricación.

La aceptación se determinó con base en el olor, midiendo el tiempo de respuesta por parte de los animales una vez que el alimento era colocado frente a ellos, en el caso del alimento comercial, los animales sentían atracción hacia él de inmediato, teniendo un tiempo de respuesta de no más de 5 segundos, en el caso del alimento



formulado, el tiempo de respuesta era de no más de 15 segundos, esto se debe a los aditivos que se utilizaron para la fabricación del alimento comercial.

### 6.3.2. Ganancia de peso de los animales durante la prueba

En la Tabla 6 se presentan los resultados obtenidos del incremento de peso semanal que tuvieron los animales a los que se les dio alimento comercial (Nutricubos marca purina®), también se muestra el incremento de peso que tuvieron los animales a los cuales se les dio el alimento formulado, el cual contenía el hidrolizado de cascarón como fuente de calcio.

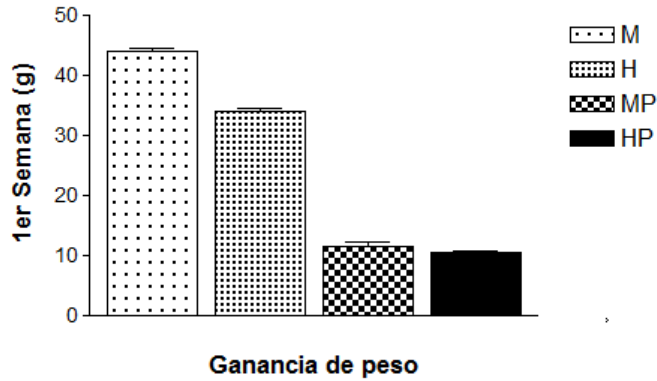
Así mismo en la Tabla 7 se presenta la cantidad de alimento consumido semanalmente por cada grupo de animales.

Grupo	1er semana (g)	2da semana (g)	3er semana (g)	4ta semana (g)
M	33.33±1.52a	44±1a	36.33±0.57a	23±1.73b
H	27±1b	34±1b	28.66±0.57b	20±1b
MP	16.75±0.50c	11.50±1c	34.75±1.50a	41.25±0.95a
HP	11±0d	10.50±0.70c	30.41b	21.41b

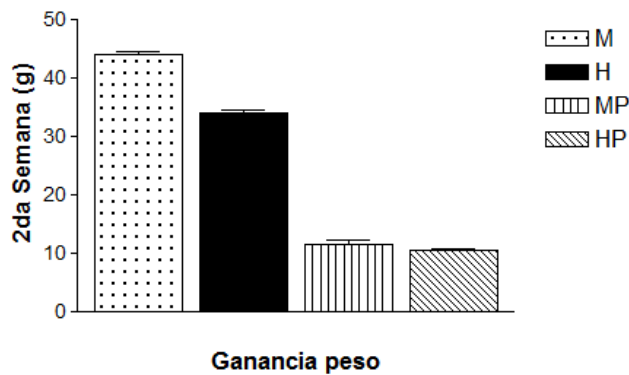
**Tabla 6. Tabla 6. Ganancia de peso por semana de cada uno de los grupos de los animales. H y M (hembras y machos a los cuales se les dio alimento comercial), HP y MP (hembras y machos problema a los cuales se les dio alimento formulado). Medias con distinta letra en la misma fila, tienen una diferencia estadística significativa. (P≤0.05). (n=4).**



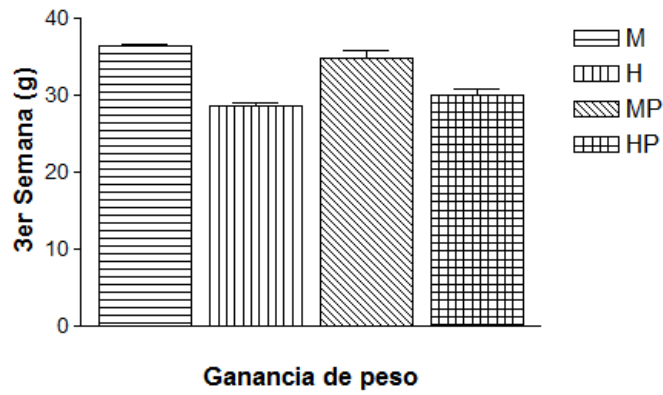
**Figura 11. Toma del peso de las ratas alimentadas con la dieta formulada (derecha) y con alimento comercial (izquierda) después de dos semanas del inicio de la prueba.**



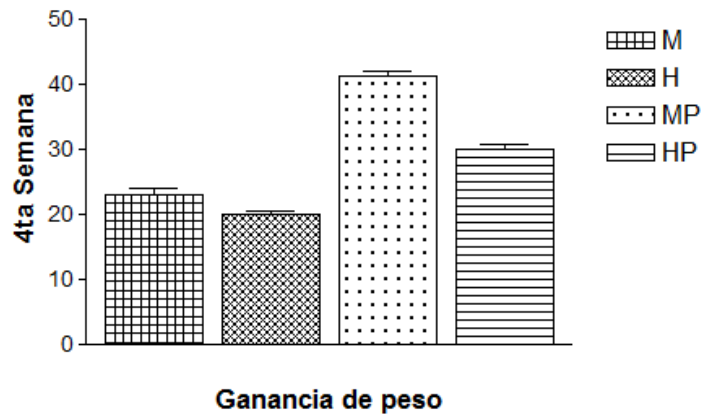
**Gráfica 1. Análisis estadístico de la ganancia de peso durante la primera semana de cada uno de los grupos. H y M (hembras y Machos a los cuales se les dio alimento comercial), HP y MP (hembras y machos problema a los cuales se les dio alimento formulado).**



**Gráfica 2. Análisis estadístico de la ganancia de peso durante la segunda semana de cada uno de los grupos. H y M (hembras y Machos a los cuales se les dio alimento comercial), HP y MP (hembras y machos problema a los cuales se les dio alimento formulado).**



**Gráfica 3. Análisis estadístico de la ganancia de peso durante la tercera semana de cada uno de los grupos. H y M (hembras y Machos a los cuales se les dio alimento comercial), HP y MP (hembras y machos problema a los cuales se les dio alimento formulado).**



**Gráfica 4. Análisis estadístico de la ganancia de peso durante la cuarta semana de cada uno de los grupos. H y M (hembras y Machos a los cuales se les dio alimento comercial), HP y MP (hembras y machos problema a los cuales se les dio alimento formulado).**

Grupo	1er semana	2da semana	3er semana	4ta semana
M	203	309	383	452
H	182	268	312	364
MP	189	185	279	504
HP	95	110	139	203

**Tabla 7. Cantidad de alimento consumido en gramos, en cada una de las semanas que se llevó a cabo el experimento. H y M (hembras y machos a los cuales se les dio alimento comercial), HP y MP (hembras y machos problema a los cuales se les dio alimento formulado).**

Como se puede observar durante las primeras dos semanas la ganancia de peso de los animales que se les dio alimento comercial fue mucho mayor a los que se les proporcionó alimento formulado. El análisis estadístico realizado muestra que durante la primera semana hubo una diferencia estadísticamente significativa en el peso ganado entre hembras y machos tanto de los animales que se les dio alimento comercial como a los que se les dio el alimento formulado, durante la segunda semana, de igual manera se puede apreciar una diferencia estadísticamente significativa entre hembras y machos pero solo del grupo de los animales a los cuales se les proporciono alimento comercial, en el caso de los animales a los que se les dio alimento formulado, tanto hembras como machos mostraban un ganancia de peso estadísticamente similar.

En la semana 3, se puede observar que la ganancia de peso entre hembras y machos de ambos grupos era estadísticamente muy similar, posteriormente en la semana 4, los machos a los cuales se les dio alimento comercial y ambos grupos de hembras, mostraban una ganancia de peso estadísticamente muy similar, en comparación al grupo de machos a los cuales se les dio alimento formulado, los cuales mostraban una ganancia de peso estadísticamente diferente en comparación de los otros animales, siendo muy superior.

Una de las razones por las cuales se dio este resultado, y la cual se puede observar, fue debido a que, los animales a los cuales se les dio alimento comercial tuvieron

una mejor aceptación de este mismo, ya que durante las primeras dos semanas se pudo observar que los animales a los cuales se les dio alimento comercial tuvieron una mayor ingesta de alimento, esto se debe a que el alimento contenía algún ingrediente (harina de pescado) el cual hacía que los animales tuvieran una mayor ingesta de alimento, provocando que su peso aumentara con mayor rapidez en un inicio. En las últimas dos semanas la ganancia de peso de ambos grupos de animales era muy similar, debido a que los animales a los cuales se les dio alimento formulado se iban adaptando a su alimento de una mejor manera.

De acuerdo con el estudio realizado por Cossio-Bolaños *et al.*, (2013) el peso ganado semanalmente y total, de cada uno de los grupos de animales, se encuentra dentro de los parámetros normales en ratas Wistar los cuales corresponden a una edad de entre un mes y un mes y medio, también se menciona que la diferencia de peso entre machos y hembras de una misma edad será distinta, presentando siempre un mayor peso los machos en comparación a las hembras.

Es importante mencionar que la diferencia de peso ganado entre ambos grupos de animales no resultaba ser un factor que afectaría el estudio, ya que solo se realizó como parte del monitoreo en el desarrollo de los animales.

### 5.3.3. Sacrificio y obtención de las muestras biológicas

Una vez realizado el sacrificio de los animales, se observaron cada una de las características superficiales e internas, para así realizar una comparación entre ambos grupos y observar si presentan alguna anomalía.



**Figura 12. Sacrificio de los animales control (se les proporciono alimento comercial).**

Se pudo observar que los animales a los cuales se les dio alimento comercial resultaban ser un poco más grandes en comparación a los animales que se les dio el alimento formulado, esto debido a que cuando se realizó el sacrificio, los animales a los que se les dio alimento comercial eran mayores por 9 días en comparación al otro grupo.

En cuanto a sus características internas de los animales, se podía observar que cada uno de sus órganos estaban en perfecto estado y no presentaban ningún tipo de anomalía en ninguno de los animales.

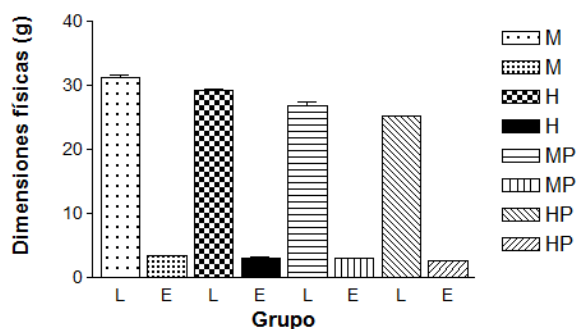
### 5.3.4. Caracterización de los huesos de las ratas

#### 5.3.4.1. Dimensiones físicas de los huesos

En la Tabla 8 se puede observar las dimensiones de los fémures de cada grupo de animales, las medidas que se realizaron con ayuda de un vernier fueron longitud y espesor, de igual manera en la gráfica 5 se muestra la comparación entre los resultados obtenidos de dichas mediciones.

Grupo	Longitud (cm)	Espesor (cm)
M	31.25±0.75a	3.41±0.14a
H	29.16±0.28b	3.08±0.14b
MP	26.87±0.77c	2.93±0.12b
HP	25.12±0.17c	2.50±0c

**Tabla 8. Longitud y espesor de los fémures de cada uno de los grupos. H y M (hembras y machos a los cuales se les dio alimento comercial), HP y MP (hembras y machos problema a los cuales se les dio alimento formulado. Medias con distinta letra en la misma fila, tienen una diferencia estadística significativa. ( $P \leq 0.05$ ). (n=4).**



**Gráfica 5. Longitud (L) y espesor (E) de los fémures de cada uno de los grupos. H y M (hembras y machos a los cuales se les dio alimento comercial), HP y MP (hembras y machos problema a los cuales se les dio alimento formulado).**

Como se observa en los resultados y con base en el análisis estadístico, se puede apreciar una ligera diferencia entre la medida de los fémures, siendo de mayor tamaño los de los animales a los cuales se les dio alimento comercial tanto en longitud como en espesor, esto se debe a que cuando se llevó a cabo el sacrificio de los animales el grupo al cual se les dio alimento comercial eran 9 días más grandes que los del grupo a los cuales se les dio alimento formulado. Cabe destacar que la diferencia en las dimensiones de los fémures de ambos grupos no resultaba ser muy significativa, esto se debe a que el alimento que se les dio a cada uno de los animales cumplía con todos los nutrientes necesarios para que tuvieran un crecimiento adecuado.

Los valores obtenidos de las dimensiones de los fémures se asemejan a los reportados por Martínez *et al* (2009) donde se reporta el crecimiento adecuado de ratas Wistar con base en su edad, encontrándose dentro de los valores de crecimiento normal en animales de una edad de entre un mes y un mes y medio, de igual manera se menciona que la dimensión de los fémures de los machos siempre será mayor en comparación al de las hembras.

#### 5.3.4.2. Prueba de dureza en los huesos

En la Tabla 9 se presentan los resultados obtenidos de la fuerza requerida para causar una fractura en los fémures de cada uno de los grupos de los animales, de igual manera en la Gráfica 6 se muestra una comparación entre los resultados obtenidos.

La fuerza ejercida para causar la fractura fue realizada justo en la parte media del fémur, tomando como referencia su longitud.

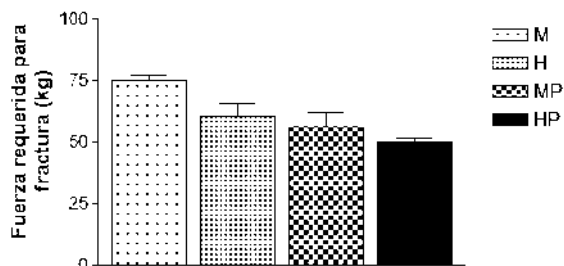




Figura 13. Fémur fracturado, perteneciente al grupo de hembras alimentadas con la dieta formulada, donde se empleó en cascarón como fuente de Ca.

Grupo	Velocidad (mm/s)	Distancia (mm)	Fuerza (kg)	Fuerza requerida para fractura (kg)
M	1	10	0.1	75.10±3.55a
H	1	10	0.1	60.61±8.55ab
MP	1	10	0.1	55.87±8.45b
HP	1	10	0.1	50.07±3.35b

Tabla 9. Parámetros para la medición y fuerza requerida para fracturar los fémures de cada grupo. H y M (hembras y machos a los cuales se les dio alimento comercial), HP y MP (hembras y machos problema a los cuales se les dio alimento formulado). Medias con distinta letra en la misma fila, tienen una diferencia estadística significativa. ( $P \leq 0.05$ ). (n=4).



Gráfica 6. Comparación entre los resultados obtenidos de la fuerza requerida para la fractura de femur. H y M (hembras y machos a los cuales se les dio alimento comercial), HP y MP (hembras y machos problema a los cuales se les dio alimento formulado).

Como se observa en los resultados, los huesos de los animales que se les dio alimento comercial, se necesitó más fuerza para causar una fractura en ellos, sin embargo esto se debe a que cuando se extrajeron los fémures, los animales a los que se les dio alimento comercial eran 9 días más grandes en comparación a los que se les dio el alimento formulado, el cual contenía el cascarón, por lo tanto se puede decir que su sistema óseo estaba un poco más desarrollado

El análisis estadístico muestra que los fémures de los machos del grupo de los animales a los cuales se les dio alimento comercial necesitaron una mayor fuerza para ser fracturados, y en cuanto a las hembras de ambos grupos y los machos del grupo que se les dio alimento comercial, resultan ser estadísticamente iguales.

Los valores obtenidos en este trabajo se asemeja a los reportados por Martínez *et al* (2009) donde se midió la dureza del fémur de ratas Wistar con base en su edad, encontrándose dentro de los valores de dureza normal en animales de una edad de entre un mes y un mes y medio, de igual manera se menciona que la diferencia de dureza de los fémures de los machos siempre será mayor en compresión a las hembras, debido a que los machos tendrán un sistema óseo con dimensiones mayores al de las hembras.

### 5.3.4.3. Determinación mineral por espectroscopia de absorción atómica.

En la Tabla 10 se presentan los resultados obtenidos de la concentración de minerales presentes en los fémures de cada grupo de los animales.

Grupo	Ca (g/kg)	Fe (g/kg)	Ni (g/kg)	Cu (g/kg)	Mg (g/kg)	K (g/kg)
M	29.12±0.05a	0.48±0.11a	0.07±0.01a	0.01±0.01a	3.88±0.03a	28.89±4.75a
H	28.36±1.64a	0.71±0.26a	0.09±0.02a	0.01±0.01a	3.84±0.26a	26.96±5.67a
MP	28.41±1.67a	0.64±0.05a	0.08±0.04a	0.01±0.01a	3.78±0.13a	29.89±9.71a
HP	28.12±1.12a	0.53±0.03a	0.06±0.01a	0.01±0.01a	3.77±0.07a	28.67±7.57a

**Tabla 10. Contenido de minerales presentes en los fémures de cada uno de los grupos. H y M (hembras y machos a los cuales se les dio alimento comercial), HP y MP (hembras y machos problema a los cuales se les dio alimento formulado). Medias con distinta letra en la misma fila, tienen una diferencia estadística significativa. (P≤0.05). (n=4).**

En general se puede observar que todos los minerales se encuentran en concentraciones similares en ambos grupos, cabe resaltar que en esta determinación no se esperaba que la concentración de los minerales fuera mayor en un grupo en comparación del otro, ya que solo se verificaría que los animales a los cuales se les dio el alimento formulado, en el cual se utilizó como fuente de calcio el cascarón, lo absorbieron y utilizaron adecuadamente, en comparación al otro grupo de animales.

Los resultados obtenidos en cuanto a la concentración de minerales se asemejan a los reportados por Basurto *et al* (2008), dicha investigación reporta la concentración de minerales presentes en el sistema óseo de ratas Wistar de una edad de entre un mes y un mes y medio.

Uno de los minerales de mayor interés era el Ca, al haber sido utilizado el producto de la hidrólisis ácida como fuente de calcio en un grupo de animales, por lo cual,

era de vital importancia conocer si había sido absorbido y utilizado correctamente. Los valores obtenidos se asemejan a los reportados por Alboniga *et al* (2018), dicha investigación mide la concentración de calcio presente en el fémur de ratas Wistar, es por ellos que nos podemos percatar que efectivamente la fuente de calcio fue absorbida y utilizado de una forma adecuada.

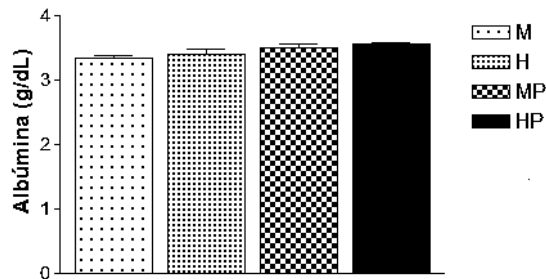
También se realizó la determinación de otros minerales como cromo y plomo, sin embargo, sus valores estaban por debajo del límite de detección utilizado (Cr 0.078 mg/L y Pb 0.18 mg/L).

#### 5.3.4.4. Determinación cuantitativa de albúmina sérica

En la Tabla 11 podemos observar los valores obtenidos de cada grupo de los animales respecto a la determinación de albúmina sérica, de igual manera, en la Gráfica 7 se presenta una comparación entre los valores obtenidos de dicha prueba.

Grupo	Albúmina (g/dL)	Valores normales (g/dL)	Desnutrición leve (g/dL)	Desnutrición moderada (g/dL)	Desnutrición grave (g/dL)
M	3.35±0.05a	3.5-5	<3.5-2.8	2.7-2.1	<2.1
H	3.40±0.15a	3.5-5	<3.5-2.8	2.7-2.1	<2.1
MP	3.49±0.10a	3.5-5	<3.5-2.8	2.7-2.1	<2.1
HP	3.57±0.02a	3.5-5	<3.5-2.8	2.7-2.1	<2.1

**Tabla 11. Contenido de albúmina sérica (g/dL) de cada grupo. H y M (hembras y machos a los cuales se les dio alimento comercial), HP y MP (hembras y machos problema a los cuales se les dio alimento formulado). Medias con distinta letra en la misma fila, tienen una diferencia estadística significativa. (P≤0.05). (n=4).**



**Gráfica 7. Comparación entre los datos obtenidos de albúmina sérica de cada grupo. H y M (hembras y machos a los cuales se les dio alimento comercial), HP y MP (hembras y machos problema a los cuales se les dio alimento formulado).**

De acuerdo a los valores de referencia reportados por Villamayor *et al.* (2006), podemos observar que los machos a los cuales se les dio alimento comercial y las hembras a las cuales se les dio alimento formulado tienen un nivel de albúmina considerado como normal, el cual se encuentra entre 3.5-5 g/dL, en el caso de las hembras a las cuales se les dio alimento comercial y los machos a los cuales se les dio alimento formulado, el resultado obtenido se encuentra entre <3.5-2.8, dicho valor es interpretado como desnutrición leve, sin embargo, como la diferencia es muy poca, y con base en el análisis estadístico realizado, esta diferencia es considerada estadísticamente irrelevante, por ende, se puede decir que los resultados de esta prueba fueron los esperados, ya que a todos los animales se les dio un alimento el cual contenía todos los nutrientes necesarios.

## VI. CONCLUSIONES

- Se concluye que la hidrólisis ácida aplicada es un proceso el cual permite obtener un alto rendimiento en la disociación de carbonato de calcio presente en el cascarón del huevo de gallina para la obtención de calcio soluble.
- Otra diferencia importante reside en la sustancia que se utiliza en el proceso de la hidrólisis ácida. El ácido acético (vinagre) es una sustancia que nos garantiza un alto rendimiento para la obtención del calcio en el cascarón del huevo de gallina, esto en comparación a otras sustancias reportadas en la bibliografía.
- No se observó ningún cambio en la calidad nutricia del alimento formulado con esta nueva fuente de calcio, se evidenció con la determinación de albúmina sérica en sangre sin diferencias estadísticas significativas entre los grupos de animales.
- Al no presentarse ningún tipo de diferencia significativa en el contenido de minerales en los fémures de ambos grupos de animales, se puede comprobar la correcta absorción y utilización del calcio obtenido como resultado de la hidrólisis ácida aplicada al cascarón.
- La prueba de dureza realizada en los fémures de los animales no muestra diferencia significativa entre ambos grupos, dichos valores obtenidos y de acuerdo con la literatura, son considerados como normales, de esta manera se comprueba nuevamente la correcta absorción y utilización del calcio

obtenido como resultado de la hidrólisis ácida aplicada al cascarón.

- Se lograron cumplir satisfactoriamente los objetivos del presente trabajo, aceptando la hipótesis y probando así la correcta absorción y utilización de calcio obtenido de la disociación del carbonato de calcio presente en el cascarón del huevo de gallina.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Aburto, A. 2008.** El huevo. Rev Cubana Aliment Nutr Vol. 18(2):15-45.
- Alboniga, O., González,S., Cabrera, N., Sanabria, J.G., Linares, E.M. 2018.** Suplementación de calcio en ratas Wistar gestantes sobre las variables antropométricas de sus crías. Rev. Ciencias Médicas de Pinar del Río. vol. 22(3):453-465.
- AOAC, 1990.** Official methods of analysis. 15th ed. USA.
- Bareto, J. 2008.** El huevo como un alimento funcional. Rev Cubana Aliment Nutr Vol. 18(2):265-278.
- Bosch, S., Rodríguez, G. 2019.** Huevos de gallina: consejos para su consumo y conservación. Revista de divulgación científica Vol 8:42-47.
- Basurto, N.R., Solís, L. y Villegas, H. 2008.** Estudio de la consolidación ósea en rata por microscopía electrónica de barrido ambiental. Rev. Vet. Méx. Vol. 39 (2): 187-198.
- Carbajal, Á. 2006.** Calidad nutricional de los huevos y relación con la salud. Rev. de Nutrición Práctica Vol. 10:73-76.
- Cordero, M., Montero, U. y Mutillo, N. 2016.** Conceptos generales sobre la albúmina humana y su utilización clínica. Rev. Acta Médica Costarricense Vol. 28(1):32-38.
- Cossio-Bolaños, M., Gómez, R., Vargas, R., Hochmuller, R.T. y Arruda, M. 2013.** Curvas de referencia para valorar el crecimiento físico de ratas machos Wistar. Rev. Nutr Hosp. Vol. 28(6):2151-2156.
- Gómez, D.L. 2011.** Cuantificación de calcio en soluciones caseras que contienen cascara pulverizada de huevo de gallina (*Gallus gallus*). Tesis Licenciatura. Universidad de San Carlos De Guatemala, Guatemala, Guatemala. 58 p.



Luna, C. 2015. Manual de un Vernier. Investigación en Ingeniería. Universidad Politécnica Hispano Mexicana, Puebla, México. 12 p.

**Martínez, E. 2016.** El calcio, esencial para la salud. Rev. Nutr Hosp Vol. 33(4):26-31.

**Martínez, V., Hernández, M. I. y Pérez, E. 2009.** Estudio de crecimiento normal y morfología de huesos de ratas de la cepa Wistar. Título Licenciatura. Universidad Autónoma de Querétaro (campus Juriquilla), Juriquilla, Querétaro.

**Maya, D.C. 2009.** Estudios nutricionales y de absorción a partir de tortilla integral de maíz elaboradas por un método ecológico de nixtamalización. Tesis maestría. Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo, Morelia, México. 78 p.

**Mendoza, Y.Y., Brambila, J.J., Arana, J.J., Sangerman- Jarquín, D.M., Molina, J.N. 2016.** El mercado de huevo en México: tendencia hacia la diferenciación en su consumo. Rev. Mex. Cienc. Agríc. Vol. 7(6): 1455-1466.

**National Institutes of Health (NIH). 2019.** Calcio. U.S. Departamento of Health & Human Services. USA. 4 p.

**NMX-F-607-NORMEX-2013.** Alimentos-Determinación de cenizas en alimentos- Métodos de prueba.

**NMX-F-608-NORMEX-2011.** Alimentos-Determinación de proteínas en alimentos- Métodos de ensayo (prueba).

**NMX-F-615-NORMEX-2018.** Alimentos-Determinación de extracto etéreo (método soxhlet) en alimentos-método de prueba.

**NOM-033-SAG/ZOO-2014.** Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres.

**NOM-062-ZOO-1999.** Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

**NOM-116-SSA1-1994.** Bienes y servicios. Determinación de humedad en alimentos por tratamiento térmico. Método por arena o grasa.

**NOM-159-SSA1-2016.** NORMA Oficial Mexicana NOM-159-SSA1- 2016, Productos y servicios. Huevo y sus productos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Método de prueba.

**Pérez, A. y Aguirre, G. 2019.** Propuesta de un proceso para la obtención de carbonato de calcio a partir de residuos de cáscara de huevo. Tesis Ingeniería. Universidad Nacional Experimental Politécnica “Antonio José de Sucre”, Barquisimeto, Venezuela. 84 p.

**Pérez, A.R., Morales, J.M., Santiago, S. 2016.** Utilización del cascarón de huevo como elemento constitutivo en agregados para aumentar las propiedades mecánicas de un material. Rev. Ingenieros Vol. 1(2):21-27.

**Restrepo-Giraldo, L.M., Arévalo-Novoa, J. y Toro-Ramos, M. 2015.** Metabolismo mineral y óseo: visión general y sus métodos de medición. Rev. Medicina & Laboratorio Vol. 21: 511-537.

**Revees, P.G. 1997.** Components of the AIN-93 Diets as Improvements in the AIN-73A Diet. J. Nutr., 197(5):838S-841S.

**Rosas, R., Gómez, N., Tomás, E., Hernández, A., Dorantes, J., García, B., Vázquez, G. 2018.** Valorización de Cáscaras de Huevo Como Suplemento de Calcio en Pasta Tipo Fettuccine. Rev. PADI Vol. 10:4-6.

**Sánchez, A., Puche, R., Zeni, S., Oliveri, B., Galich, A.M., Maffei, L., Poudes, G., y Bregn, C. 2002.** Papel del calcio y de la vitamina D en la salud ósea (parte 1). Rev. Reemo Vol. 11(6):201-217.

**Santana, S. 2018.** El huevo como aliado de la nutrición. Rev Cubana Aliment Nutr Vol. 18(2 Supl 1):S1-S15.

**Sevilla, S. 2015.** Calidad y manejo de huevo para plato. Tesis Ingeniería. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro División de Ciencia Animal, Saltillo, México. 81 p.

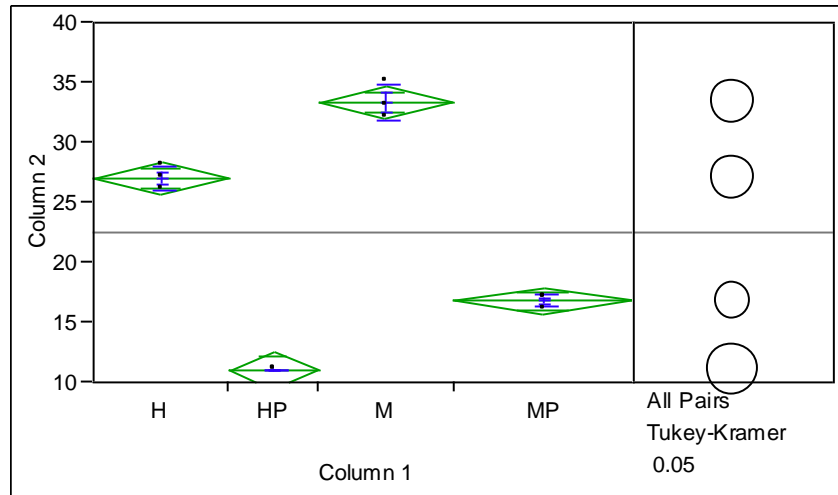
**Urbano, E. 2015.** Extracción a escala de laboratorio del complejo de proteínas presentes en las membranas intersticiales de residuos de cáscara de huevo de

gallina (*Gallus Domesticus*) mediante el proceso de hidrólisis alcalina. Título ingeniería. Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador. 220 p.

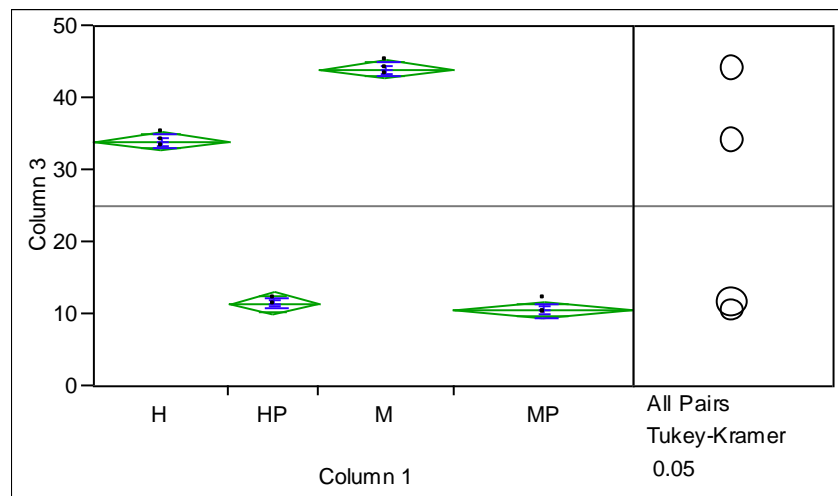
**Valdés, J. 2009.** La cáscara del huevo: ¿desecho o calor agregado para la salud humana y la producción avícola? Una experiencia cubana. Rev. Cubana Aliment Nutr Vol. 19:84-102.

**Villamayor, B.L., Llimera, R.G., Vidal, V.J., Pérez-Crespo, C., Iniesta, N.C. Mira, S.M.C. y Martínez, P.M. 2006.** Valoración nutrimental al ingreso hospitalario: iniciación al estudio entre distintas metodologías. Rev. Nutr. Hosp. Vol. 21(2):163-172.

## ANEXOS



**Figura 12. ANOVA de ganancia de peso durante la primera semana de cada uno de los grupos. H y M (hembras y Machos a los cuales se les dio alimento comercial), HP y MP (hembras y machos problema a los cuales se les dio alimento formulado). Column 1 (animales), Column 2 (ganancia de peso g).**



**Figura 13. ANOVA de ganancia de peso durante la segunda semana de cada uno de los grupos. H y M (hembras y Machos a los cuales se les dio alimento comercial), HP y MP (hembras y machos problema a los cuales se les dio alimento formulado). Column 1 (animales), Column 3 (ganancia de peso g).**

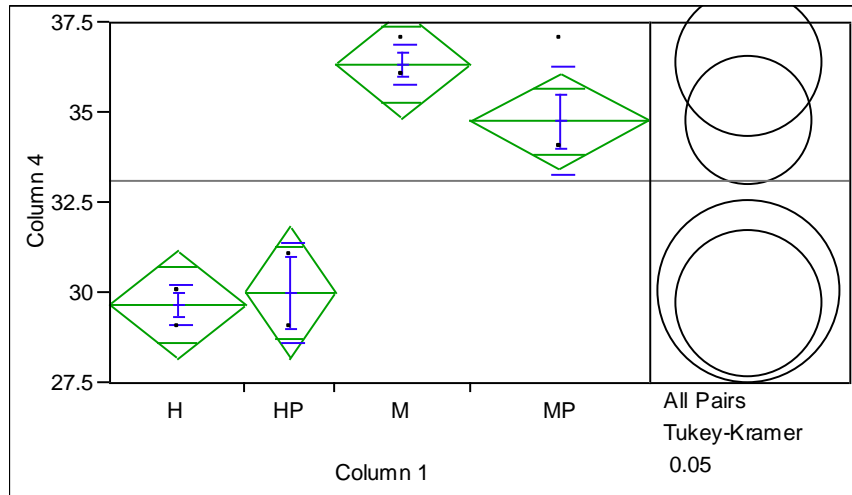


Figura 14. ANOVA de ganancia de peso durante la tercera semana de cada uno de los grupos. H y M (hembras y Machos a los cuales se les dio alimento comercial), HP y MP (hembras y machos problema a los cuales se les dio alimento formulado). Column 1 (animales), Column 4 (ganancia de peso g).

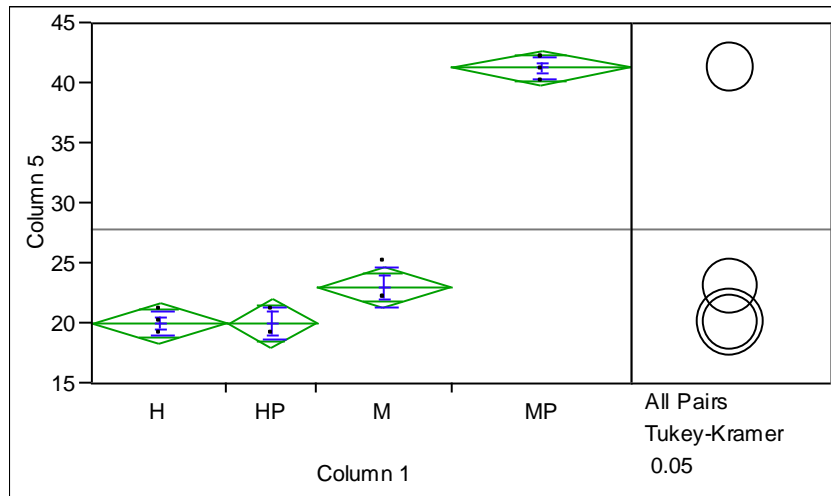


Figura 15. ANOVA de ganancia de peso durante la cuarta semana de cada uno de los grupos. H y M (hembras y Machos a los cuales se les dio alimento comercial), HP y MP (hembras y machos problema a los cuales se les dio alimento formulado). Column 1 (animales), Column 5 (ganancia de peso g).

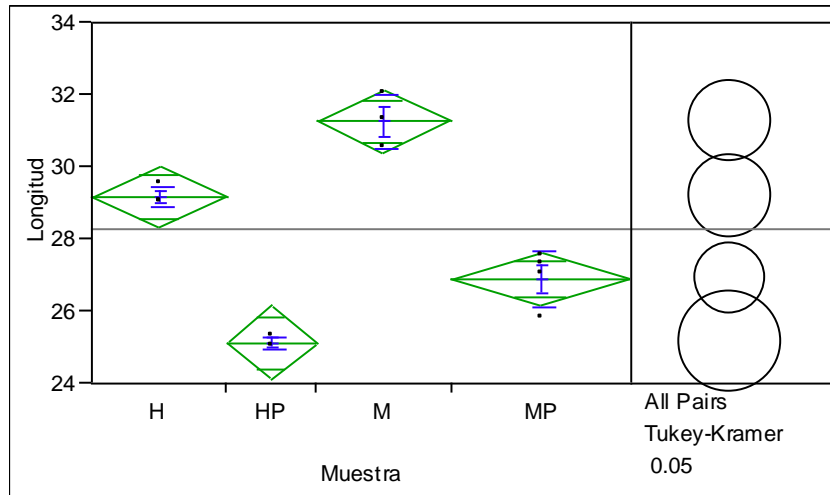


Figura 16. ANOVA de la longitud de los fémures de cada uno de los grupos. H y M (hembras y machos a los cuales se les dio alimento comercial), HP y MP (hembras y machos problema a los cuales se les dio alimento formulado).

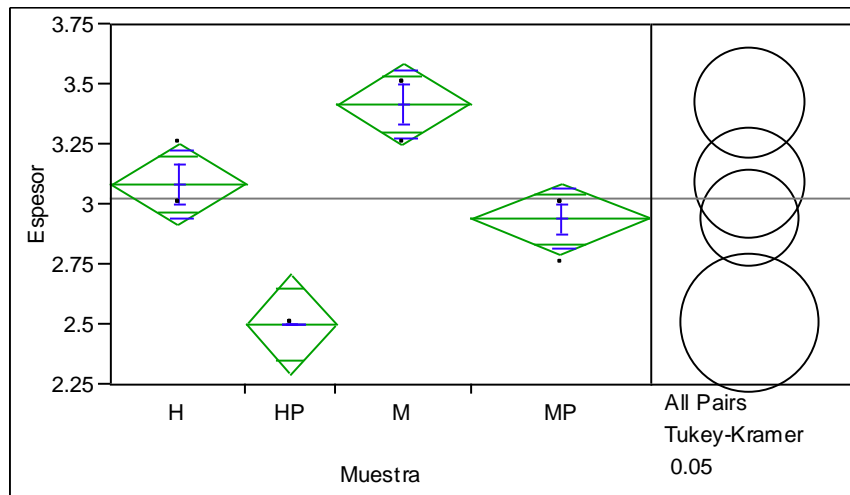
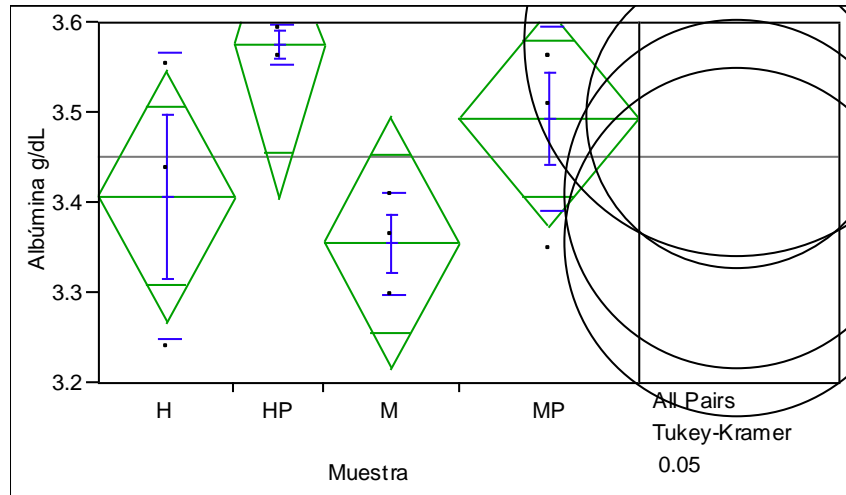


Figura 17. ANOVA del espesor de los fémures de cada uno de los grupos. H y M (hembras y machos a los cuales se les dio alimento comercial), HP y MP (hembras y machos problema a los cuales se les dio alimento formulado).



**Figura 20. ANOVA de los datos de albúmina sérica de cada grupo. H y M (hembras y machos a los cuales se les dio alimento comercial), HP y MP (hembras y machos problema a los cuales se les dio alimento formulado).**