

Trabajo de Investigación Para Optar al Título de Magister en Ciencias Farmacéuticas y
Alimentarias

**OBTENCIÓN DE UN FERTILIZANTE FOLIAR A PARTIR DEL
HIDROLIZADO PROTEICO DE LA MEMBRANA DE LA CÁSCARA
DE HUEVO**



Natalia Andrea Mendoza Isaza

Asesor:

Carlos Alberto Peláez Jaramillo

Grupo Interdisciplinario de Estudios Moleculares

Universidad de Antioquia

Medellín

2017

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS.....	5
LISTA DE TABLAS.....	7
1. RESUMEN.....	8
2. ABSTRACT.....	10
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	12
4. HIPÓTESIS.....	14
5. JUSTIFICACIÓN.....	15
6. OBJETIVOS.....	16
6.1 Objetivo general.....	16
6.2 Objetivos específicos.....	16
7. ANTECEDENTES.....	17
7.1 Residuo.....	17
7.2 El reciclaje.....	18
7.3 Cáscara de huevo.....	18
7.3.1 Capa de las membranas de la cáscara.....	19
7.3.2 Capa en empalizada.....	20
7.4 Usos de la cáscara de huevo.....	20
7.4.1 Calcio como suplemento nutricional.....	20
7.4.2 Cáscara de huevo en polvo.....	21
7.4.3 Uso de la cáscara de huevo como catalizador para síntesis.....	21
7.4.4 Hidroxiapatita.....	21
7.4.5 Membrana de la cáscara de huevo.....	22
7.4.6 Remoción de metales pesados.....	22
7.5 Aminoácidos.....	23
7.5.1 Clasificación de los aminoácidos.....	23
7.6 Hidrólisis de proteínas.....	24
7.6.1 Hidrólisis enzimática.....	24
7.6.2 Hidrólisis ácida.....	24

7.6.3	Hidrólisis básica	25
7.7	Fertilizantes	25
7.7.1	Clasificación de los fertilizantes según su forma de obtención	25
7.7.2	Clasificación de los fertilizantes según su forma de actuar	26
7.7.3	Fertilizantes a base de aminoácidos	26
7.7.4	Fertilización foliar	28
7.7.5	Factores que influyen la fertilización foliar	29
7.7.6	Ventajas del uso de aminoácidos en la fertilización foliar.....	31
7.8	Modelos	32
7.8.1	Modelo químico	32
7.8.2	Modelo biológico	33
8.	METODOLOGIA	37
8.1	Separación de la membrana de la cáscara de huevo.....	37
	La cáscara de huevo material de estudio para esta investigación, fue suministrada por <i>Avinal S.A. Medellín, Colombia</i>	37
8.2	Caracterización de la membrana	38
8.3	Hidrólisis de proteína	39
8.4	Determinación del grado de hidrólisis.....	40
8.5	Estudios de fitotoxicidad de los hidrolizados.....	44
8.6	Cuantificación del contenido de aminoácidos libres	45
8.7	Formulación de fertilizante foliar líquido.....	46
8.8	Evaluación de la eficiencia del fertilizante formulado en un cultivo modelo	48
9.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
9.1	Proceso de separación	51
9.2	Caracterización de la membrana	51
9.3	Hidrólisis de proteína	52
9.4	Grado de hidrólisis	52
9.5	Pruebas de fitotoxicidad	57
9.6	Formulación del fertilizante foliar líquido	67
9.7	Evaluación de la eficiencia del fertilizante formulado en un cultivo modelo	69

10.	CONCLUSIONES	72
11.	IMPACTO AMBIENTAL	74
12.	BIBLIOGRAFIA	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la cáscara	19
Figura 2. Estructura de un aminoácido	23
Figura 3 . Fotografía de <i>P. vulgaris</i>	33
Figura 4. Fotografía de <i>R. sativus</i> : (a) semilla; (b) detalle de la plántula: 1, cotiledones; 2, hipocótilo; 3, raíz embrionaria o radícula	35
Figura 5 Mecanismo de la titulación con formol para la determinación de α -AN.....	41
Figura 6. Foto de matera plástica y sus dimensiones	48
Figura 7. Condiciones de la fase experimental	49
Figura 8. Espectro de masas del hidrolizado con HCl	54
Figura 9. Espectro de masas de hidrolizado con H ₂ SO ₄	54
Figura 10. Espectro de masas del hidrolizado con H ₃ PO ₄	54
Figura 11. Espectro de masas hidrolizado con HNO ₃	54
Figura 12. Placa Cromatográfica de todos los hidrolizados comparado con cada estándar de aminoácido y una mezcla de la misma a 100 ppm.....	55
Figura 13. Placa Cromatográfica de todos los hidrolizados a las diferentes concentraciones comparado con una mezcla estándares de aminoácidos a 200 ppm.....	56
Figura 14. Germinación para hidrolizado con HCl 6 M (100 – 75 – 50 – 25 %)	57
Figura 15. Germinación para hidrolizado con H ₂ SO ₄ 6 M (100 – 75 – 50 – 25 %)	57
Figura 16. Germinación para hidrolizado con HCl 6 M (25 – 12.5 – 6.25 – 3.2 %)	58
Figura 17. Germinación para hidrolizado con H ₂ SO ₄ 6 M (25 – 12.5 – 6.25 – 3.2 %)	59
Figura 18. Germinación para hidrolizado con HCl 6 M (12.5 – 6.25 – 3.2 - 1.6 – 0.8 %).	60
Figura 19. Germinación para hidrolizado con H ₂ SO ₄ 6 M (6.25 – 3.2 – 1.6 – 0.8 – 0.4 %)	61
Figura 20. Efecto de los hidrolizados a diferentes concentraciones sobre <i>R. sativus</i>	61
Figura 21. Germinación para hidrolizado con H ₂ SO ₄ 6 M (1.6 – 0.8 – 0.4 – 0.2 %)	62
Figura 22. Germinación para hidrolizado con HCl 6 M (1.6 – 0.8 – 0.4 – 0.2 %)	63
Figura 23. Efecto de los hidrolizados a diferentes concentraciones sobre <i>R. sativus</i>	63
Figura 24. Efecto de los hidrolizados a diferentes concentraciones sobre <i>R. sativus</i>	64
Figura 25. Curva de calibración para la cuantificación de aminoácidos.....	66

Figura 26. Biomasa total de cada tratamiento comparado con el control positivo (A-MICSUR).....	69
Figura 27. Biomasa total de cada tratamiento comparado con el control positivo (A-MICSUR).....	70
Figura 28. Biomasa de los frutos para el tratamiento con HCl comparado con el control positivo (A-MICSUR).....	70
Figura 29. Biomasa de los frutos para el tratamiento con H ₂ SO ₄ comparado con el control positivo (A-MICSUR).....	71

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Phaseolus vulgaris</i>	34
Tabla 2. Clasificación taxonómica del modelo <i>R. sativus</i>	36
Tabla 3. Condiciones de hidrólisis	40
Tabla 4. Formulación de fertilizante	47
Tabla 5. Composición del fertilizante comercial A-MICSUR.....	49
Tabla 6. Caracterización de la membrana	52
Tabla 7. Reconocimiento de aminoácidos y proteínas.....	53
Tabla 8. Contenido de aminoácidos libres en hidrolizados.....	66
Tabla 9. Fuente de componentes para la formulación del fertilizante foliar.....	67
Tabla 10. Caracterización fisicoquímica de los fertilizantes foliares formulados	68

1. RESUMEN

El huevo es considerado por la organización mundial de la salud, como la fuente de proteína de mayor calidad y más económica del mercado mundial, el cual además se consolida en el territorio nacional como producto de los hogares colombianos.

El consumo de huevo se ha visto impulsado en los últimos 40 años, así lo demuestran las cifras de la Federación Nacional de Avicultores de Colombia (Fenavi), que indican que el consumo per cápita anual pasó de 42 huevos en 1970 a 263 en el 2016 [1]. Por lo tanto el alto consumo de huevo genera a su vez altas cantidades de cáscara, un residuo sólido que de no ser dispuesto de una forma correcta facilitaría putrefacciones, transmisión de olores desagradables, mosquitos y microorganismos patógenos que pueden ocasionar riesgos sanitarios y efectos adversos sobre el ambiente.

En los últimos años se han realizado diferentes investigaciones en pro de darle una revalorización a los residuos en el sector de la producción de huevos. Como alternativas no alimentarias humanas existe un abanico de posibilidades, entre los que se destaca el uso del carbonato de calcio (CaCO_3) proveniente de la cáscara de huevo para la fabricación de envases ecológicos [2], el uso de la cáscara como catalizador en reacciones de síntesis [3-4], conversión directa y síntesis de Hidroxiapatita a través de la cáscara de huevo [5-6], remoción de metales pesados [7-10], entre otros.

Por otra parte la membrana de la cáscara de huevo es un material promisorio para diversas aplicaciones debido a su contenido proteico, entre el que se destaca el colágeno de tipo I, V y X, los cuales pueden ser usados en diferentes campos como la industria cosmética, farmacéutica y bioquímica [11].

Teniendo en cuenta lo anterior, el presente trabajo tiene como objetivo principal, obtener un hidrolizado proteico de la membrana de la cáscara de huevo para formular un fertilizante foliar a través del cual se le pueda dar una correcta disposición y una valorización a las cáscaras de huevo.

El presente texto se centra en primera instancia, en establecer un protocolo eficiente para la separación de la membrana de los residuos de la cáscara de huevo, usando un método físico

y uno químico. Posterior a la separación, la membrana se caracterizo fisicoquímica. Por otra parte, basados en los reportes de la literatura, se seleccionaron cuatro ácidos inorgánicos para hidrolizar la proteína presente en la membrana, usando como referencia el acido clorhídrico con el cual es el más usado en hidrólisis ácida.

Se evaluó la actividad fitotóxica de los hidrolizados a diferentes concentraciones, usando como modelo biológico Rábano (*Raphanus sativus*). Se formuló un fertilizante foliar a partir de los hidrolizados de la membrana y se determinó su eficiencia en un cultivo modelo de *Phaseolus vulgaris* y se comparó con dos testigos, que incluyeron un fertilizante foliar a base de aminoácidos libres y el otro sin el uso de fertilización.

Palabras clave: Cáscara de huevo, membrana, hidrolisis ácida, aminoácidos libres, fertilizante foliar, *Raphanus sativus*, *Phaseolus vulgaris*.

2. ABSTRACT

The egg is considered by the world health organization as the highest quality and cheapest source of protein on the world market, which also consolidates in the national territory as a product of Colombian households.

Egg consumption has been boosted in the last 40 years, as shown by figures from the National Poultry Federation of Colombia (Fenavi), which indicate that annual per capita consumption rose from 42 eggs in 1970 to 225 in 2011 [1]. Therefore high egg consumption generates high amounts of shell, a solid residue which, if not disposed of correctly, would facilitate putrefaction, transmission of unpleasant odors, mosquitoes and pathogenic microorganisms which may cause health risks and adverse effects on the environment.

In the last years, several investigations have been carried out in order to give a revaluation to the residues in the sector of the production of eggs. As a non food alternative there is a wide range of possibilities, including the use of calcium carbonate (CaCO_3) from the eggshell for the production of organic packaging [2], the use of the shell as a catalyst in reactions of synthesis [3-4], direct conversion and synthesis of hydroxyapatite through the eggshell [5-6], heavy metal removal [7-10], among others.

On the other hand the membrane of the eggshell is a promising material for diverse applications due to its protein content, among which the type I, V and X collagen, which can be used in different fields as the cosmetic industry, Pharmaceutical and biochemistry [11].

Taking into account the above, the main objective of this work is to obtain a protein hydrolyzate from the eggshell membrane in order to formulate a foliar fertilizer through which it can be given a correct arrangement and a valorization to the shells of egg.

The present text focuses in the first instance, to establish an efficient protocol for the separation of the membrane of the residues of the eggshell, using a physical and a chemical method. After the separation, the physicochemical characterization of the membrane was performed. On the other hand, based on the reports of the literature, four inorganic acids

were selected to hydrolyze the protein present in the membrane, using hydrochloric acid with which it is reported as the most used in acid hydrolysis.

The phytotoxic activity of the hydrolysates was evaluated at different concentrations, using as a biological model Radish (*Raphanus sativus*). A foliar fertilizer was formulated from the membrane hydrolyzates and its efficiency in a model crop of *Phaseolus vulgaris* and compared with two controls, which included a foliar fertilizer based on free amino acids and the other without the use of fertilization.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El huevo es un alimento de la canasta familiar, altamente nutricional. Representa una fuente de proteínas de alta calidad a bajo costo y contiene muchos nutrientes, como ácido fólico, colina, hierro, selenio y vitaminas A, B, D, E, K y también es fuente de antioxidantes [10].

La cáscara es un residuo sólido procedente de las plantas de incubación, plantas productoras de huevo comercial, fábricas de ovoproductos y uso doméstico, lo cual conlleva a la generación de toneladas que deben disponerse correctamente de tal manera que se excluyan los riesgos sanitarios y ambientales. Los desafíos asociados con la disposición de la cáscara de huevo incluyen costo, disponibilidad y disposición de sitios, olores, insectos y microorganismos. Estos desafíos son mitigados con los métodos tradicionales para la disposición de este residuo, los cuales incluyen botaderos, acondicionador de suelos ácidos en la agricultura, fuente de calcio para los animales, o a través de la modificación de Carbonato de calcio (CaCO_3) principal componente, en cal o hidróxido de calcio (Ca(OH)_2) sustituto o fertilizante.

Teniendo en cuenta que la membrana de la cáscara de huevo tiene un alto contenido de componentes bioactivos, así como la propiedad de retener el agua y de ser biodegradable, la hace una candidata para aplicaciones clínicas, cosméticas, nutracéuticas y de nanotecnología [11]. La membrana de la cáscara de huevo está constituida por proteína (69.2%), grasa (2.7%), humedad (1.5%) y cenizas (27.2%). El componente proteínico de la membrana de la cáscara de huevo tiene un 10% de colágeno [9]. El colágeno es de tipo I, V y X el cual puede ser utilizado en la producción cosmética.

La fertilización foliar es una práctica común e importante para los productores, porque corrige las deficiencias de nutrientes en las plantas, favorece el buen desarrollo de los cultivos y mejora el rendimiento y la calidad del producto. La fertilización foliar no substituye a la fertilización radicular de los cultivos, pero sí es una práctica que sirve de apoyo para completar los requerimientos nutricionales de un cultivo que no se pueden abastecer mediante la fertilización común al suelo [12].

Los fertilizantes foliares a base de aminoácidos libres, actúan como activadores del desarrollo vegetativo, mejoran el calibre y coloración de los frutos, etc. El aporte de aminoácidos facilita que la planta ahorre energía en sintetizarlos, a la vez que facilita la producción de proteínas, enzimas, hormonas, etc., compuestos importantes para todos los procesos vitales de los vegetales [13].

Ante esta situación se presenta como alternativa el aprovechamiento de la membrana de la cáscara de huevo, para la obtención de un hidrolizado proteico aprovechando el alto porcentaje de este tipo de sustancias en el subproducto avícola para la formulación de un fertilizante foliar a base de aminoácidos libres. Con esto se busca un valor agregado a la producción de huevos.

4. HIPÓTESIS

Es posible obtener un fertilizante foliar de alto valor agregado a partir de la hidrolisis de la membrana de la cáscara de huevo.

5. JUSTIFICACIÓN

En Colombia se consumen a diario toneladas de huevos procedentes de las fábricas de ovoproductos y de consumo directo, los cuales a su vez producen un residuo sólido: cáscara de huevo, que representa aproximadamente un 11% del peso de la composición del huevo [14], este residuo también es generado en las incubadoras y en las plantas productoras de huevo comercial como subproducto.

En el país se produjeron aproximadamente 11.247 millones de huevos en el año 2013, cifra que refleja además la generación de una cantidad de residuos sólidos que si no se disponen de una forma adecuada pueden ocasionar problemas ambientales y de salud pública.

A través del reúso de las cáscaras de huevo, surgen nuevas posibilidades de disposición y aprovechamiento tanto de la fracción orgánica como de la inorgánica.

En los últimos años se ha venido estudiando la recuperación y reutilización de recursos biológicos, entre las cuales se encuentra el aprovechamiento de la cáscara de huevo con el fin de darle un valor agregado a la producción de huevos fértiles.

El abastecimiento de los nutrimentos a través del suelo está afectado por muchos factores de diferentes tipos: origen del suelo, características físicas, químicas y biológicas, humedad, plagas y enfermedades. Por consiguiente, habrá casos en que la fertilización foliar sea más ventajosa y eficiente para ciertos elementos, que la fertilización al suelo [12]. Este trabajo busca darle un valor agregado a las cáscara de huevo por medio del aprovechamiento de la membrana de la cáscara, usándola como fuente para la obtención de un hidrolizado proteico con el fin de obtener aminoácidos libres presentes en esta, como cisteína, histidina, triptófano, lisina, arginina, leucina, valina, ácido glutámico, prolina, triptófano y β -hidroxilo, etc. [15]. Estos subproductos pueden ser aplicados a las plantas a través del formulado de un fertilizante foliar, disminuyendo así la dependencia de productos de síntesis en los distintos cultivos, lo cual convertiría a este fertilizante en una alternativa fiable y sostenible en la agricultura.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Obtener un fertilizante foliar de alto valor agregado a partir del hidrolizado proteínico de la membrana de la cáscara de huevo.

6.2 Objetivos específicos

- Establecer un protocolo eficaz y eficiente para obtener la membrana proteínica de la cáscara de huevo.
- Evaluar el mejor proceso para hidrolizar la proteína.
- Producir un fertilizante a partir del hidrolizado de proteína proveniente de la cáscara de huevo.
- Determinar la eficacia del fertilizante formulado en cultivos modelo.

7. ANTECEDENTES

El proceso de producción de huevos, tanto en granja como a nivel industrial, genera una cantidad importante de residuos, los cuales se deben de disponer de tal forma que no generen un posible riesgo de contaminación ambiental. Por consiguiente, se requiere la aplicación de estrategias de manejo de reciclaje, que contribuyan al correcto uso de residuos y su forma de aprovechamiento.

Las técnicas existentes para el tratamiento de residuos, incluyen la reutilización y/o transformación, convirtiéndolas así en las opciones con mayores posibilidades por ser adecuadas técnicamente, viables económicamente y sustentables ecológicamente.

7.1 Residuo

Un residuo se describe como el material que pierde utilidad tras haber cumplido con su misión o servicio para realizar un determinado trabajo. El concepto se emplea inadecuadamente como sinónimo de basura por hacer referencia a los desechos que el hombre ha producido. [16].

Un residuo, es todo elemento que está considerado como un desecho al cual hay que disponer. Se supone, por lo tanto, que el residuo carece de valor económico. Pese a que los residuos suelen ser acumulados en vertederos o enterrados para que complete allí el proceso de descomposición sin afectar el entorno, en los últimos años han avanzado procesos como volver a emplearse, que consiste en la recuperación de los residuos para transformarlos en un objeto con nueva vida útil [16].

La clasificación de los residuos puede hacerse dependiendo de su proveniencia como domiciliarios, comerciales, industriales, hospitalarios, etc.

7.2 El reciclaje

Es el proceso mediante el cual se transforma materiales usados, que de otro modo serían simplemente desechos, en recursos valiosos [17].

El uso del reciclaje tiene ventajas importantes:

- Reduce la necesidad de vertederos y del proceso de incineración.
- Evita la contaminación causada por la fabricación de productos a partir de materiales vírgenes.
- Ahorra energía, reduce la emisión de gases de efecto invernadero que contribuyen al cambio climático y global.
- Ahorra en recursos naturales como son el uso de madera, agua y minerales.
- Ayuda a mantener y proteger el medio ambiente para las generaciones futuras.

El residuo cáscara de huevo obtenido de diferentes procesos industriales donde se usa el huevo, representa una pérdida significativa para el procesador, ya que tradicionalmente las cáscaras son inútiles. La mayoría de estos subproductos comúnmente se eliminan en un vertedero sin tratamiento previo, esto definitivamente no es una práctica adecuada teniendo la emisión de olores.

7.3 Cáscara de huevo

Es una biocerámica compuesta de una fase orgánica y otra inorgánica. Químicamente está compuesta de 1,6% de agua, 93,57 % de minerales, 0,8% de carbonato de magnesio y 0,73% de fosfato tricálcico, y finalmente 3,3% de materia orgánica [18].

La Figura 1 muestra la composición de la cáscara de huevo con el respectivo espesor de cada parte.

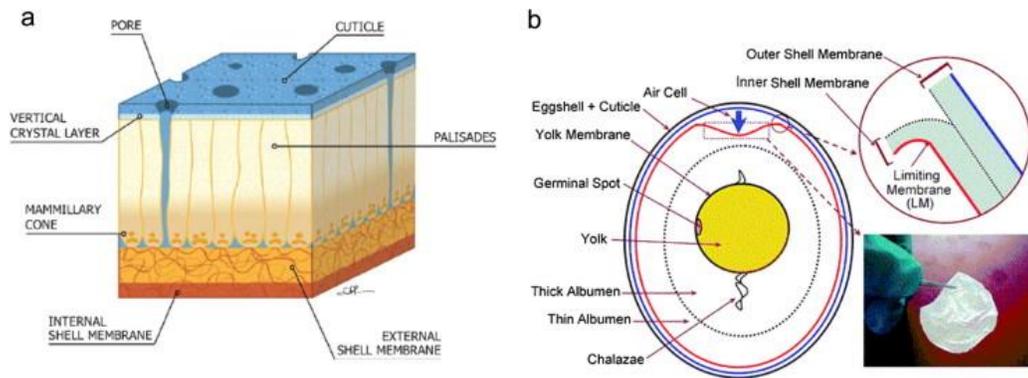


Figura 1. Estructura de la cáscara

Tomado de, "Eggshell membrane biomaterial as a platform for applications in materials science.,"

7.3.1 Capa de las membranas de la cáscara

Las membranas de la cáscara corresponden a la capa más interna de la cáscara del huevo y están formadas por un entramado fibrilar. Las fibras que las componen pesan en conjunto aproximadamente 145 mg, tienen un espesor de alrededor de 70 nm y consisten en un núcleo central cubierto por un material amorfo llamado manto de diferente composición química.

Las membranas de la cáscara se encuentran dispuestas en dos capas, una interna de 20 μm de grosor que está en contacto con la albúmina y otra externa de 50 μm de grosor que está situada entre la zona mineralizada de la cáscara y la membrana interna. Estas dos membranas están en íntimo contacto en toda su extensión, excepto a nivel de la cámara de aire donde se encuentran separadas.

La fracción orgánica de las membranas de la cáscara está constituida por 3% de lípidos, 2% de azúcares y 95% de proteínas.

Por otra parte, la presencia de colágeno fue sugerida por el aislamiento de hidroxilisina de las membranas de la cáscara. Posteriormente se inmunodetectó la presencia de colágeno tipo I, predominantemente en las fibras gruesas de las membranas de la cáscara externa y colágeno tipo V predominantemente en las fibras finas de la membrana. Más recientemente

se ha detectado colágeno tipo X como principal constituyente de las fibras de las membranas [18].

7.3.2 Capa en empalizada

La capa en empalizada corresponde a la capa más gruesa de la cáscara de huevo (200-350 μm) y está constituida por componentes orgánicos e inorgánicos en forma integrada. El componente inorgánico corresponde a carbonato de calcio en forma de calcita y el componente orgánico (matriz de la cáscara), que corresponde al 2-5 % (peso seco) es en un 2 % proteico [18].

7.4 Usos de la cáscara de huevo

Las cáscaras de huevo son una gran fuente de minerales, las cuales pueden tener potenciales usos en diferentes áreas como excipiente farmacéutico, material base para el desarrollo de preparativos medicinales y dentales, suplemento de calcio y aditivo de alimentos, componente de enmiendas para la agricultura y componente para implantes de hueso [10].

7.4.1 Calcio como suplemento nutricional

El carbonato de calcio de la cáscara de huevo en su forma cruda, sin un previo tratamiento ácido tiene baja solubilidad pero puede ser usado como fuente de calcio para otras sales de calcio tales como, citrato, fosfato, lactato y gluconato. El citrato de calcio obtenido desde la cáscara de huevo puede ser usado para proveer solubilidad y alta biodisponibilidad de calcio para usarlo como suplemento nutricional humano [10].

7.4.2 Cáscara de huevo en polvo

La ventaja de la cáscara de huevo en comparación con otras fuentes naturales de calcio es el bajo nivel de sustancias tóxicas presentes. Ocasionalmente, parte de este residuo es usado como fertilizante debido a su alto contenido de calcio y nitrógeno. Sin embargo, las cáscaras de huevo son un residuo potencial de contaminación cuando no se gestionan adecuadamente dado que son soporte de acción microbiana. Estudios enfocados en la conversión de cáscara en alimento animal (particularmente para aves de corral) recomiendan un pre tratamiento de aproximadamente 80°C para reducir la contaminación microbiana de la cáscara en polvo [10]. La cáscara también se ha evaluado como fuente de calcio para la alimentación humana[19].

7.4.3 Uso de la cáscara de huevo como catalizador para síntesis

El uso de la cáscara de huevo como catalizador ha sido evaluado en la conversión de aceite de haba de soja a transesterificación en la producción de biodiesel. Analizando diferentes condiciones del proceso, concluyendo que el CaO fue la fase activa derivada de la cáscara [10]. A demás se ha evaluado en la síntesis de otros compuestos como aceite de de Girasol, aceite de Palma Africana, Mostaza, etc., con resultados satisfactorios [3-4].

7.4.4 Hidroxiapatita

Se comparó la capacidad de regeneración de hueso en un conejo en el cual se usó hidroxiapatita sintética y la obtenida a partir de cáscara de huevo. Encontrándose que se logró una mayor formación de hueso con la hidroxiapatita obtenida a partir de cáscara [10]. También se obtuvo la hidroxiapatita a partir de conversión directa y síntesis a partir de la cáscara de huevo [5-6].

7.4.5 Membrana de la cáscara de huevo

Algunas de las aplicaciones de la membrana de la cáscara de huevo incluyen el uso como adsorbente de metales pesados y como una membrana semipermeable para el control de transporte de partículas [20], se ha usado la proteína presente en la membrana para mejorar las propiedades de los biomateriales utilizados en aplicaciones de ingeniería de tejidos [21], Como sustrato natural para la inmovilización y detección de ADN [22], Capacidad de absorción de colorantes textiles en la membrana [23], Preparación de nanopartículas de oro [24], Soporte para la inmovilización de enzimas [25], Absorción selectiva de arseniato y especies inorgánicas de arsénico [26] entre otras.

La membrana contiene cerca de 30% de queratina, la cual es separada por diferentes métodos para diversas aplicaciones [27].

7.4.6 Remoción de metales pesados

Es reportado en algunos trabajos el uso de la cáscara de huevo como adsorbente de metales pesados en los cuales se aprovecha la composición y estructura de este material [28], [7-10].

Considerando los promisorios usos estudiados para el aprovechamiento de un residuo tan común como lo es la cáscara de huevo, se propone como una nueva alternativa económica y sencilla la valoración de la misma por medio del uso de la membrana de la cáscara como fuente de proteína para la obtención de aminoácidos libres con el objetivo de formular un fertilizante foliar.

7.5 Aminoácidos

Los aminoácidos son la unidad estructural de las proteínas. Un aminoácido posee dos grupos funcionales característicos: un grupo -NH_2 y un grupo carboxílico -COOH (de ahí su nombre). En general, todos los aminoácidos de un hidrolizado de proteínas son del tipo alfa, ver figura 2.

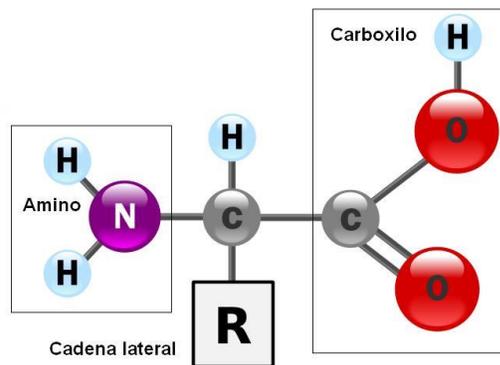


Figura 2. Estructura de un aminoácido

Tomado de: Tesis “Estudio de las propiedades físicas y funcionales de un hidrolizado enzimático de proteína de Chocho a escala piloto y su aplicación como fertilizante” [13].

Donde R representa un sustituyente característico del aminoácido en cuestión y que es el que le distingue de los demás [29].

7.5.1 Clasificación de los aminoácidos

Se pueden clasificar atendiendo a su carácter ácido o básico. Así podrán ser:

- Neutros: alifáticos, aromáticos y azufrados.
- Básicos
- Ácidos

7.6 Hidrólisis de proteínas

En el proceso de hidrólisis se transforman moléculas de gran tamaño (estructura primaria) en productos más sencillos y fácilmente degradables. La hidrólisis tiene como finalidad fragmentar las proteínas en aminoácidos.

7.6.1 Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática de proteínas para el análisis de aminoácidos es raramente aplicada, dado que esta hidrólisis no se desarrolla en una sola reacción. Se trata de un conjunto de reacciones simultáneas de ruptura de enlaces, con distintas especies cargadas en equilibrio, lo que da una gran complejidad a este tipo de procesos.

La ventaja de la hidrólisis enzimática es que permite la cuantificación de la asparraguina y la glutamina y de otros residuos sensibles a la destrucción durante la hidrólisis ácida [30].

7.6.2 Hidrólisis ácida

La hidrólisis ácida con ácido clorhídrico (HCl) es reportada en la literatura como el método más común de hidrólisis. Esto se debe a la conveniencia del uso de este reactivo, como puede ser el uso en ambos modos en fase líquida-gaseosa y puede ser evaporado posteriormente. El proceso puede ser realizado con pequeñas cantidades del sustrato, un factor importante cuando se tiene pequeñas cantidades de proteína disponible.

La hidrólisis ácida convencional es realizada con HCl 6 M por 20 o 24 horas a 110°C a presión reducida. Bajo las condiciones de hidrólisis ácida convencional asparraguina y glutamina son completamente hidrolizados a ácido aspártico y ácido glutámico, respectivamente. El triptófano es completamente destruido [30].

7.6.3 Hidrólisis básica

La hidrólisis básica es casi exclusivamente usada para la determinación de triptófano el cual es estable bajo estas condiciones. Este tipo de hidrólisis es también aplicada a proteínas que contienen un gran porcentaje de carbohidratos, como es el caso con alimentos y en la formulación de soluciones farmacéuticas proteicas, las cuales incluyen alto porcentaje de monosacáridos.

La hidrólisis alcalina es usualmente realizada con NaOH, KOH [30].

7.7 Fertilizantes

Son sustancias que se aplican directa o indirectamente a las plantas, para favorecer su crecimiento, aumentar su producción o mejorar su calidad [31].

La tendencia del mercado mundial está enfocada en el uso de fertilizantes de origen orgánico, con el fin de obtener cultivos más limpios y sanos para el consumo humano. Por esta razón los aminoácidos se ajustan como la principal fuente de selección en la formulación de fertilizantes ya que son 100% de origen orgánico, además cumplen con una función sustancial en el ahorro de energía en la elaboración de proteínas, permitiendo que las plantas reaccionen de una forma inmediata, pues los nutrientes (aminoácidos libres) van en su fase final para el aprovechamiento óptimo de las plantas [32].

7.7.1 Clasificación de los fertilizantes según su forma de obtención

El número de materiales usados como fertilizantes es muy alto; su composición y procedencia son muy diversas y sus posibilidades de utilización son múltiples.

Muchos residuos son usados como fertilizantes desde el inicio de la agricultura; otros fertilizantes sin embargo, son modernos productos de síntesis. Algunos fertilizantes se producen y utilizan en la explotación agrícola, los demás se adquieren en el mercado.

- Fertilizantes naturales: son aquellos que se han formado por medios naturales y que se utilizan con o sin ningún tipo de transformación. Por ejemplo el estiércol (fresco o descompuesto), el follaje.
- Fertilizantes sintéticos: son producidos por medios técnicos, ya sea por transformación química de productos naturales o por sistemas de síntesis de materiales elementales.

7.7.2 Clasificación de los fertilizantes según su forma de actuar

- Fertilizantes de efecto directo (abonos para las plantas) contienen proporciones importantes de sustancias nutritivas para las plantas, a las cuales abastecen directamente; a este grupo pertenece, por ejemplo, la mayor parte de fertilizantes comerciales N, P y K, y también el estiércol líquido y semilíquido.
- Fertilizantes de efecto indirecto (enmiendas del suelo) mejoran sobre todo el sustrato nutritivo [31].

7.7.3 Fertilizantes a base de aminoácidos

Los aminoácidos intervienen en la regulación endógena del crecimiento y desarrollo vegetal.

Las plantas sintetizan los aminoácidos a través de reacciones enzimáticas por medio de procesos de animación y transaminación. Los productos con contenidos de aminoácidos libres se caracterizan por ser capaces de mejorar el torrente circulatorio de la planta evitando, por una parte, el gasto energético y formando, a su vez, parte de los componentes de la planta.

7.7.3.1 Efectos de los aminoácidos en las plantas

- Resistencia al estrés: Las altas temperaturas, enfermedades, heladas, etc., repercuten sobre las plantas. Los aminoácidos y principalmente la Prolina actúan reduciendo este riesgo.
- Efecto sobre la fotosíntesis: Algunos aminoácidos como la Glicina y el ácido L - Glutámico incrementan la concentración de clorofila en consecuencia aumenta la fotosíntesis.
- Síntesis de proteínas: Los L- aminoácidos se unen para formar proteínas
- Efecto quelante: algunos aminoácidos como la Glicina y los ácidos Glutámico y Aspártico que tienen carga negativa son capaces de retener cationes formando quelatos.
- Efecto sobre la polinización y cuajado de frutos: Está demostrado que aminoácidos como la Prolina, Glutámico y la Glicina, aumentan la germinación del grano de polen alargando el tubo polínico.
- Apertura de estomas: Aminoácidos como la Prolina frenan la producción de ácido abscísico y en forma conjunta con el Glutámico favorece la apertura de estomas [33].

7.7.3.2 Los aminoácidos como nutriente vegetal y colaborador en su crecimiento y desarrollo.

La incorporación a las plantas de aminoácidos provenientes del medio externo puede realizarse por dos vías: radicular y foliar.

En condiciones naturales la vía radicular es el mecanismo usual de ingreso de aminoácidos externos. Los aminoácidos que se encuentran libres en la solución del suelo pueden acceder al apoplasto radicular por difusión y/o transporte en masa y, de allí ser absorbidos por las células epidérmicas y del parénquima cortical de la raíz. En condiciones normales, y dadas

las bajas concentraciones de los aminoácidos en la solución del suelo, esta absorción solo aporta una muy pequeña parte del total del nitrógeno absorbido por la raíz. Si se aplican disoluciones de aminoácidos al suelo la concentración de la solución en estos compuestos aumenta, con lo que se estimula pasivamente su absorción. La eficiencia de esta vía de administración es, no obstante muy variable debido también al aprovechamiento de los microorganismos del suelo.

La vía de penetración foliar es muy utilizada en la agricultura para administrar distintas sustancias a los cultivos (fitosanitarios, reguladores del crecimiento, herbicidas, fertilizantes foliares, etc.). Esta forma de absorción conlleva la penetración de la solución aplicada, a través de los estomas y/o de la cutícula de las hojas, hasta el apoplasto foliar. Al ser un proceso pasivo no se produce modificación importante de la composición inicial de la solución, salvo si se trata de algunas sustancias muy sensibles a la modificación química, física o biológica. Como puede suponerse, la administración de soluciones de aminoácidos por esta vía es generalmente mucho más eficiente a corto plazo que la radicular [32].

7.7.4 Fertilización foliar

La fertilización foliar es una técnica que permite la incorporación del fertilizante en la planta a través de las hojas. De este modo se logra que el producto se encuentre disponible para el cultivo inmediatamente sin necesidad de lluvia para la incorporación, factor primordial en los fertilizantes sólidos ya que presentan absorción radicular.

7.7.4.1 Respuesta a la fertilización foliar.

Varios son los elementos a medir o estudiar luego de una fertilización foliar. En cultivos extensivos se ve reflejado en: número de vainas, número de granos por vaina, el tamaño de los granos, el color de la pigmentación de la planta y el desarrollo radicular [34].

7.7.5 Factores que influyen la fertilización foliar

Para el éxito de la fertilización foliar es necesario tomar en cuenta tres factores, formulación foliar, ambiente y los de la planta.

7.7.5.1 *Relacionados con la formulación foliar*

La concentración de la sal portadora del nutriente, el pH de la solución, la adición de coadyuvantes y el tamaño de la gota del fertilizante líquido al momento de la aplicación.

- pH de la solución: La característica de la solución por asperjar, es de primordial importancia en una práctica de fertilización foliar. El pH de la solución y el ión acompañante del nutrimento por aplicar influyen en la absorción de éste en la hoja.
- Surfactantes y adherentes: La adición de surfactantes y adherentes a la solución favorece el aprovechamiento del fertilizante foliar. El mecanismo de acción de un surfactante consiste en reducir la tensión superficial de las moléculas de agua, permitiendo una mayor superficie de contacto con la hoja; un adherente permite una mejor distribución del nutrimento en la superficie de la hoja evitando concentraciones de este elemento en puntos aislados cuando la gota de agua se evapora.
- Nutrimento y el ion acompañante en la aspersion: La absorción de nutrimentos está relacionada con la capacidad de intercambio catiónico en la hoja, y la valencia del ion, por lo tanto, los iones monovalentes penetran con mayor facilidad que los iones con mayor número de valencias. Los iones más pequeños en su diámetro penetran más rápidamente que los iones de mayor tamaño.

7.7.5.2 Relacionados con el ambiente

Se debe considerar la temperatura del aire, el viento, la luz, humedad relativa y la hora de aplicación.

- **Temperatura y humedad relativa:** Con alta temperatura y baja humedad relativa, hay mayor evaporación de la solución, provocando una concentración de sales que puede llegar a niveles tóxicos y causar daños por quema de follaje. Aunque también la humedad relativa favorece la penetración de los nutrientes al mantener húmeda la hoja. De esta manera se ha reportado la temperatura adecuada de aplicación de 18 – 25°C y la humedad relativa alrededor de un 70%.
- **Luz y hora de aplicación:** La luz es un factor importante en la fotosíntesis y para que una planta pueda incorporar nutrientes y metabolitos se requiere de un proceso fotosintéticamente activo en la planta. La hora de aplicación debe de practicarse o muy temprano o en las tardes, según las condiciones de la región.

7.7.5.3 Relacionados con la planta

Se toma en cuenta la especie del cultivo, estado nutricional, etapa de desarrollo y edad de las hojas.

- **Edad de la planta y hoja:** La aplicación foliar de nutrientes también está afectada por el estado de desarrollo de la planta. Se indica, aunque existen pocos datos, que las plantas y hojas jóvenes son las que tienen mayor capacidad de absorción de nutrientes vía aspersión foliar y desde luego deben de tener las hojas un déficit de esos nutrientes en su desarrollo [35].

En general la fertilización foliar reúne una serie de estrategias para el aporte de sustancias o soluciones de elementos esenciales en la planta vía aérea encaminadas a mejorar

directamente los procesos de absorción, transporte y transformación de los nutrientes en la hoja, tallos o frutos, donde se aprovecha los mecanismos de toma pasiva y activa que ocurren en estos órganos.

De acuerdo a la reglamentación del Instituto Agropecuario ICA, un fertilizante foliar con aminoácidos al ser analizado en las pruebas de registro, debe de cumplir para los aminoácidos libres con una desviación admitida no mayor al 5 % del valor declarado en la etiqueta.

Adicionalmente debe de cumplir con los siguientes valores mínimos de concentración:

Nitrógeno Total (N)	0.9 %
Nitrógeno Orgánico (N)	0.4 %
Fósforo asimilable (P)	0.9 %
Potasio soluble en agua (K)	0.9 %

La desviación admitida para los contenidos de materia orgánica será del 10% de la composición garantizada en la etiqueta.

Como norma general para todos los productos con materia orgánica, se fijan además las siguientes desviaciones en valores absolutos [32]:

Extracto húmico total	0.8 %
Ácidos húmicos	0.8 %
Carbono orgánico	5.0 %

7.7.6 Ventajas del uso de aminoácidos en la fertilización foliar

Los aminoácidos son utilizados por las plantas en su metabolismo y tienen un doble efecto: por un lado, ahorran energía metabólica en la síntesis de los mismos y, por otro lado, consiguen aportar osmolitos de efectos fisiológicos concretos. Favorecen la acumulación de nutrientes esenciales como K^+ , Ca^{2+} , N y P.

Además de la función nutricional, los aminoácidos pueden actuar como reguladores del transporte de microelementos, ya que son capaces de formar complejos con metales. En este sentido, diversas investigaciones dan cuenta de su función como agentes complejantes para diversos elementos como el hierro, favoreciendo su transporte y penetración en el interior de los tejidos vegetales.

Para que la planta pueda incorporar los aminoácidos en su metabolismo, es necesario que sean aminoácidos libres o péptidos de muy bajo peso molecular. De esta forma, entrarán fácilmente a la planta a través de las raíces o en aplicación foliar, penetrando en las hojas por difusión, para ser posteriormente transportados a los órganos del vegetal donde se requiere una mayor demanda de ellos [36].

7.8 Modelos

Los modelos son en algunos casos constructos conceptuales pero en otros son sistemas fisicoquímicos y/o biológicos simples en los cuales se pueden definir y controlar de forma efectiva un número finito de variables que hacen reproducible y confiable los resultados obtenidos de la perturbación del sistema en estudio. Muchos de ellos son observados directamente [37].

7.8.1 Modelo químico

El modelo químico se describe como imparcial, únicamente definido, y modelo teórico uniformemente aplicable para predecir propiedades químicas de un sistema. Un modelo químico consiste generalmente en la combinación de un método teórico y un sistema base. Cada par único de un método con un sistema base representan una aproximación diferente a la ecuación de Schrödinger [38].

7.8.2 Modelo biológico

Una gran parte de investigadores trabajan con organismo vivos llamados modelos, los cuales son mantenidos y estudiados en condiciones de laboratorio con el fin de evaluar el efecto de factores ambientales o sustancias químicas.

7.8.2.1 *Phaseolus vulgaris*

Comúnmente conocido como frijol, habichuelas, porotos, aluvias, judías y otros (Figura 2). Es una planta dicotiledónea, herbácea intensamente cultivada desde la zona tropical hasta las templadas. Es originario de América y su clasificación taxonómica se muestra en la Tabla 1.

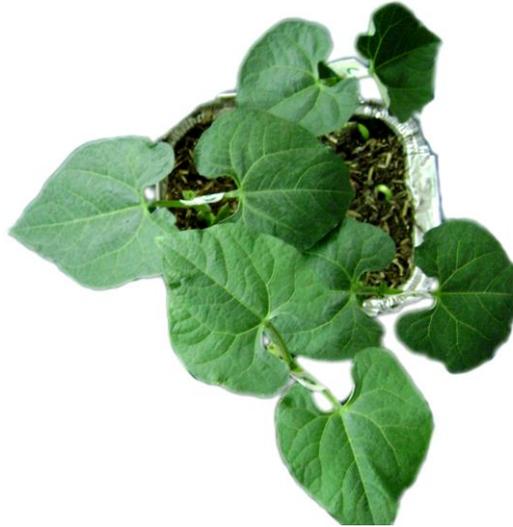


Figura 3 . Fotografía de *P. vulgaris*.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Phaseolus vulgaris*

Clasificación taxonómica	
Reino	Plantae
División	Magnoliosida
Orden	Fabales
Familia	Fabaceae
Genero	Phaseolus
Especie	Phaseolus vulgaris follardo

Es una planta muy estudiada por su valor nutricional, el género *Phaseolus* es una de las bases para alimentación humana, ya que es la principal fuente de proteína; es rico en lisina pero deficiente en aminoácidos como: metionina, cisteina y triptófano; por lo cual una dieta adecuada en aminoácidos esenciales se logra al combinar con cereales (arroz, maíz, otros).

Las principales ventajas como modelo biológico son: tiempo de germinación y crecimiento corto, se adapta bien desde 200 hasta 1.500 msnm. El pH óptimo para frijol está comprendido entre 6,5 y 7,5 aunque es tolerante a pH entre 4,5 y 8,2 [39].

Phaseolus vulgaris, se caracteriza por su porte arbustivo, erecto con ramas laterales cortas, flores blancas y su buena tolerancia a enfermedades, tales como Antracnosis, roya, oídium, fusarium y mancha de la hoja, permitiendo un cultivo exitoso y competitivo. A comparación con otras variedades, alcanza una altura entre 40 a 45 cm, por esta razón es recomendable que la semilla se siembre de 2 a 3 cm de profundidad.

7.8.2.2 *Raphanus sativus*

Comúnmente conocido como rábano (Figura 3) es una dicotiledónea y posiblemente derivada de *Raphanus maritima* de las costas del Mediterráneo, Se encuentra en varias partes del mundo, sobre todo de clima subtropical, su clasificación taxonómica se muestra en la Tabla 2.



Figura 4. Fotografía de *R. sativus*: (a) semilla; (b) detalle de la plántula: 1, cotiledones; 2, hipocótilo; 3, raíz embrionaria o radícula

Tabla 2. Clasificación taxonómica del modelo *R. sativus*.

Clasificación Taxonómica	
Phylum	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Capparales
Familia	Brassicaceae
Género	<i>Raphanus</i>
Nombre científico	<i>Raphanus sativus</i>

8. METODOLOGIA

Para la formulación del fertilizante a partir de la membrana de la cáscara de huevo se llevaron a cabo las siguientes etapas:

- Optimización del proceso para la separación de la membrana de la cáscara de huevo.
- Caracterización proximal de la membrana.
- Identificación del proceso de hidrólisis de proteínas para la obtención de los aminoácidos libres.
- Determinación del grado de hidrólisis de la proteína.
- Cuantificación del contenido de aminoácidos.
- Formulación de fertilizante líquido.
- Evaluación de la eficiencia del fertilizante formulado en un cultivo modelo.

A continuación se detalla cada uno de los ítems.

8.1 Separación de la membrana de la cáscara de huevo

La cáscara de huevo material de estudio para esta investigación, fue suministrada por *Avinal S.A. Medellín, Colombia*.

Una vez desechada la cáscara de huevo en la actividad productiva de Avinal, el material debió de ser recogido en contenedores limpios y adecuados que se puedan mantener en zonas refrigeradas y libres de microorganismos, con el fin de minimizar su crecimiento. Luego de la recolección el producto en unas condiciones óptimas de seguridad y salubridad se separaron los restos líquidos de la cáscara de huevo a través de un lavado con agua potable, seguido de un tratamiento térmico para la pasteurización y neutralización de los elementos bacterianos que contenga; para la separación de la membrana de la cáscara, se tomo la cáscara previamente lavada, pasteurizada y seca.

La separación de la membrana de la cáscara de huevo es un proceso clave a la hora de realizar un escalado industrial para obtener este biomaterial disponible, por lo tanto a esta etapa se le ha atribuido significativa atención. En algunos de los reportes encontrados en la

literatura se encuentran métodos que implican la separación manual, el uso de tratamientos ácidos entre los que se incluyen el ácido acético, ácido clorhídrico y EDTA. Los tratamientos ácidos actúan principalmente en la superficie de la cáscara de huevo, disolviendo el carbonato de calcio. El uso de ácidos en el proceso de separación tienen la desventaja en este caso específico de desnaturalizar el colágeno [21]. Recientemente se ha desarrollado un método mecánico para la separación de la membrana por flotación en el cual se pueden obtener porcentajes de recuperación de la membrana de hasta un 96 % y 99 % de carbonato de calcio presente en la cáscara en dos horas de operación [40].

El método utilizado para la separación de la membrana de la cáscara de huevo consistió en un proceso de separación por flotación en el cual se molió la cáscara en húmedo y se mantuvo en agitación constante. Conjuntamente se hizo pasar un flujo de aire a través de la dispersión sólido-líquida, el cual arrastra en su movimiento ascendente la membrana por ser el componente más liviano, mientras que el carbonato de calcio de la cáscara sedimenta en el fondo del recipiente. Posteriormente la membrana y las partículas de carbonato de calcio se recogieron por separado.

La separación de la membrana de la cáscara se obtuvo a través de la molienda en húmedo de 300 g de cáscara de huevo pasteurizada y 1000 mL de agua potable, con agitación constante, posteriormente se hizo pasar un flujo de aire para separar por flotación la membrana de la cáscara y por último con el fin de purificar la membrana de cualquier remanente de cáscara, se usó una solución de ácido acético 0.01 M, se lavó con potable y se puso a secar en estufa a 50 °C.

8.2 Caracterización de la membrana

La membrana seca se pesó y se determinó el contenido de proteína por el método de Kjeldahl, cenizas, humedad, grasas y capacidad de retención de agua. Esta caracterización se realiza de acuerdo a los protocolos utilizados en el laboratorio Grupo interdisciplinario de Estudios Moleculares (GIEM).

Para la determinación del contenido de proteína por el método de Kjeldahl se llevó a cabo el siguiente procedimiento.

Se pesó en la balanza analítica entre 0,1 y 1,0 g de la membrana de la cáscara de huevo seca y pasada por malla # 30.

Se transfirió la muestra al tubo de prueba y se ubicó en la gradilla de la unidad de digestión. Se Pesó el catalizador de Devarda sobre papel kraft y se transfirió al tubo de prueba.

Para iniciar la destilación, se procedió a seleccionar el método 02 DEVARDA al momento de seleccionar el método, se adicionaron 50 mL de solución de ácido bórico al 2,0 % y 100 mL de agua destilada.

Se Adicionó al destilado 3 gotas de indicador de Tashiro (la solución se torna verde) y se Tituló con ácido clorhídrico 0,1 M (previamente estandarizado) hasta cambio de color de verde a azul/violáceo.

8.3 Hidrólisis de proteína

En la literatura se describen las condiciones detalladas de la hidrólisis acida. La hidrólisis con ácido clorhídrico (HCl) es el método más comúnmente empleado. La hidrólisis ácida convencional usa HCl 6 M durante 20 a 24 horas a 110 °C en vacío [30].

Para la hidrólisis de la proteína presente en la membrana de la cáscara de huevo, se evaluaron cuatro ácidos inorgánicos a tres concentraciones diferentes a una presión de 15 psi, una temperatura de 100 °C y 120 °C un tiempo de hidrólisis de 1 h, 2 h y 4 h. En la Tabal 3 se muestran las condiciones de hidrólisis.

Tabla 3. Condiciones de hidrólisis

Ácido	Concentración (M)
HCl	1.5, 3, 6
HNO ₃	1.5, 3, 6
H ₂ SO ₄	1.5, 3, 6
H ₃ PO ₄	1.5, 3, 6

La proporción de membrana seca y molida en proporción con el ácido fue de 1:2, 1:3 y 1:4. En los ensayos se pesó la membrana seca, molida y pasada por malla # 30, se adicionó el volumen del ácido a evaluar y se llevó a la autoclave bajo las condiciones establecidas.

8.4 Determinación del grado de hidrólisis

El grado de hidrólisis (GH) es definido como el porcentaje de aminoácidos libres separados de la proteína, el cual fue calculado como la proporción entre los α -amino nitrógenos (AN) y el nitrógeno total (NT). El AN fue determinado por el método de titulación con formaldehído [41].

La titulación con formaldehído es un método rápido, preciso y conveniente para detectar el grupo amino de los aminoácidos. El formaldehído es adicionado a la solución y reacciona con el grupo amino de la cadena de la proteína, el cual libera una cantidad equivalente de H^+ , el cual puede ser estimado por titulación con NaOH. Este método se considera útil en la determinación de la concentración de los α -AN.

Usando el método de titulación con formol (Figura 5), el aminoácido libre que contiene un α -NH₂- solo podrá reaccionar con una molécula de formol.

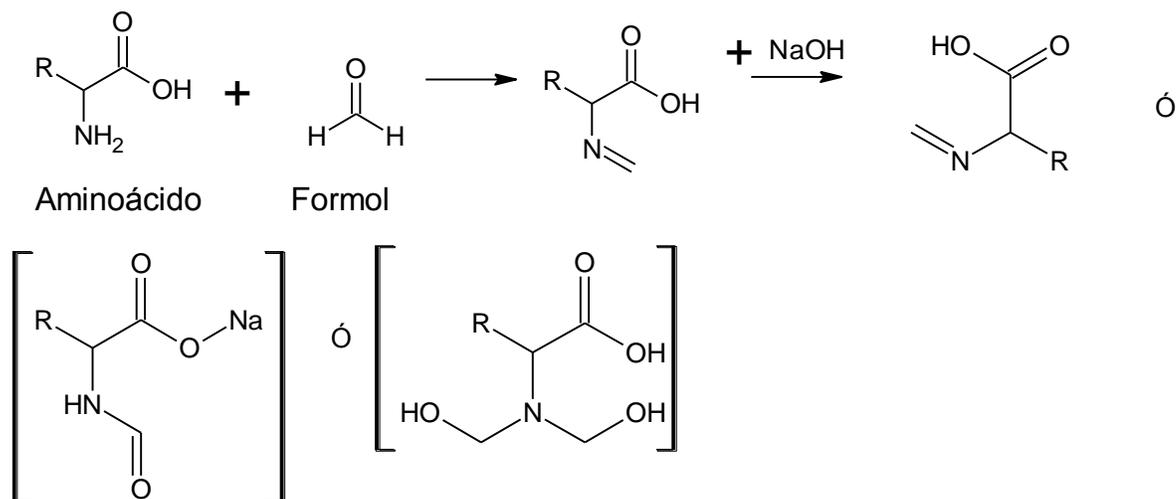


Figura 5 Mecanismo de la titulación con formol para la determinación de α -AN

Tomado de: Artículo "Comparison of Chromatographic and Titrimetric Methods for the Determination of the α -amino Nitrogen in Standard Solution and Fish Protein Hydrolysates" [42]

Se tomaron 10 mL de hidrolizado de proteína y se le adicionaron 10 mL de agua destilada se agitó y se ajustó el pH a 7.0 con una solución de NaOH 0.1 M, posteriormente se adicionaron 10 mL de solución de formaldehido al 37 % (v/v) y se tituló con una solución estándar de NaOH 0.1 M hasta pH 9.5 usando el pH-metro. El NT fue determinado por el método de Kjeldahl. La concentración de α -AN fue calculada usando la siguiente ecuación.

$$C_{\alpha\text{-AN}} (\text{Mm}) = \frac{\Delta V \times n \times 10^3}{V}$$

Donde ΔV es el volumen en mL de NaOH usados en la titulación; n (mol/L) es la concentración molar de la solución de NaOH; y V es el volumen de hidrolizado.

El grado de hidrólisis se cálculo de acuerdo a la siguiente ecuación.

$$\text{GH} (\%) = \frac{\alpha\text{-Amino Nitrógeno (AN)}}{\text{Nitrógeno total (NT)}} \times 100$$

- **Reacción de Biuret:** Esta prueba es positiva para sustancias que contengan dentro de la molécula varios grupos amida muy cercanos dando coloración usualmente violeta-purpura. Cuando se adiciona una pequeña cantidad de sulfato de cobre (II) en medio alcalino. La coloración se debe a la formación de un complejo de coordinación entre el Cu^{2+} y los grupos amida de las uniones peptídicas. A medida que progresa la hidrólisis de una proteína, el color producido en la prueba de Biuret se decolora gradualmente a rosa y después desaparece ya que los péptidos más pequeños y los aminoácidos no dan coloración.

Se tomó 1 mL de cada hidrolizado previamente neutralizado y diluido (1/25) para evitar interferencias de color, se le adicionó 2 mL de hidróxido de sodio al 20 % y 0.5 mL de solución de sulfato de cobre al 1 %, se usó como prueba positiva la Albumina de suero Bovino.

- **Reacción de Ninhidrina:** la ninhidrina (hidrato de tricetohidrindeno) un agente oxidante, reacciona con los α -aminoácidos a un pH entre 4 y 8 para dar un compuesto de color azul-purpura. Esta reacción se efectúa también con aminas primarias y amoníaco pero sin desprendimiento de CO_2 .
Los aminoácidos prolina e hidroxiprolina, también reaccionan con la ninhidrina pero en este caso se obtiene un color amarillo.

Se tomó 1 mL de cada hidrolizado diluido (1/25) a un pH entre 4 y 8, se le adicionó 1 mL de reactivo de Ninhidrina, se llevó a ebullición en baño María, se usó Glicina como prueba positiva.

- **Reacción Xantoprotéica:** el ácido nítrico concentrado reacciona con algunas proteínas que contengan en su estructura aminoácidos con anillos aromáticos, dando un color amarillo que se oscurece hasta anaranjado cuando se añade un álcali. Esta reacción es positiva para las proteínas que contienen fenilalanina, tirosina o triptófano.

Se tomó 1 mL de cada hidrolizado diluido (1/25) y previamente neutralizado, se le adicionó 1 mL de ácido nítrico concentrado y se calentó al baño María hasta cambio de coloración. Posteriormente se alcalinizó la mezcla adicionando gota a gota hidróxido de sodio al 25 %. Se uso como prueba positiva tirosina.

- Reacción de aminoácidos azufrados: Los aminoácidos que contengan azufre, como es el caso de la cisteína y la metionina, reaccionan con el acetato de plomo en medio básico formando un precipitado negrozco de sulfuro de plomo.

Se tomó 1 mL de cada hidrolizado diluido (1/25) y previamente neutralizado, se adicionaron 2 mL de hidróxido de sodio al 20 %, se calentó en baño María y por último se adicionaron 10 gotas de solución de acetato de plomo al 5 %. Se usó cisteína como prueba positiva.

Espectrometría de masas

Se realizó un análisis de espectrometría de masas a cada hidrolizado, con el fin de tener un indicio de la presencia de aminoácidos libres, lo cual daría indicios de que tan eficiente es cada acido para hidrolizar la proteína.

Separación de aminoácidos por cromatografía de capa fina

Posterior a confirmar la presencia de aminoácidos en las hidrólisis realizadas con los diferentes tipos de ácidos, se realizo una separación de los aminoácidos a través de cromatografía de capa fina.

Fase estacionaria: Silica gel

Fase móvil: se evaluaron las siguientes mezclas

3:2:1 2-Butanol: Ácido acético glacial: Agua

3:1 2-Butanol: Hidróxido de amonio

Revelador: Ninhidrina al 0.2 %

Se preparó una mezcla estándar de aminoácidos a 100 ppm y soluciones de los aminoácidos individuales a una 200 ppm los cuales son los patrones y se siembran en la silica gel con los hidrolizados, se lleva a la cámara se deja hasta el frente de solvente, se aplica el revelador y por último se seca para observar el color que indica la presencia o ausencia de los aminoácidos.

8.5 Estudios de fitotoxicidad de los hidrolizados

La evaluación de la fitotoxicidad de cada hidrolizado se realizó a través del índice de germinación (IG) y longitud de radícula de semillas seleccionadas de *Raphanus sativus*.

La prueba de fitotóxicidad consistió en adicionar 5 mL de cada sistema a evaluar sobre discos de impregnación de papel de 8 cm de diámetro en cajas de petri, las cuales contenían 20 semillas de *Raphanus sativus*. Se evaluaron diferentes concentraciones (100 – 75 – 50 – 25 - 12.5 - 6.25 - 3.2 - 1.6 - 0.8 - 0.4 - 0.2 – 0.1) % y 5 mL de agua como control. Se dejaron en la oscuridad por 48 horas y se procedió a contar el número de semillas de rábano germinadas. A cada semilla que germinó, se le midió la longitud de la radícula y el peso total de las radículas este procedimiento se realizó de acuerdo a los protocolos utilizados en el laboratorio Grupo interdisciplinario de Estudios Moleculares (GIEM).

El índice de germinación fue determinado dividiendo el número de semillas germinadas sobre el total de semillas por cien.

Se usaron semillas con las siguientes especificaciones:

Lote # 461179-38

% Germinación 90

Pureza 99 %

Análisis 03/2013

8.6 Cuantificación del contenido de aminoácidos libres

La determinación de aminoácidos a través de un análisis espectrofotométrico de sus sales de cobre, se basó en la formación de compuestos solubles de cobre, por medio de la reacción del aminoácido y un exceso de cobre presente en forma de fosfato de cobre. Algunos aminoácidos forman sales de cobre escasamente solubles a estas condiciones (Por ejemplo, Cisteína, Metionina, Triptófano, Leucina y Fenilalanina) por lo tanto el método requiere la mezcla de cantidades conocidas de otros aminoácido adecuados (Alanina o Glicina), a través de la cual se forman sales mixtas de cobre solubles que pueden ser cuantificadas [43].

La glicina fue elegida como estándar debido a su relativa alta solubilidad, su fácil purificación, su bajo costo y porque da una intensidad de color cerca a un color intermedio entre los otros aminoácidos.

Preparación de soluciones

- Solución de cloruro de cobre, se disolvieron 2.8 g de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en agua destilada y se llevó a 100 mL en balón volumétrico.
- Solución de fosfato trisódico dodecahidratado, se disolvieron 6.85 g de $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ en agua destilada y se llevó a 100 mL en balón volumétrico.
- Solución de tetraborato de sodio, se disolvieron 5.0375 g de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ en agua destilada y se llevó a 500 mL en balón volumétrico, antes de aforar se verificó que el pH estuviera entre 9.1 – 9.2. La solución debe de ser filtrada antes del uso.
- Para la preparación de la solución de fosfato de cobre, se tomaron 40 mL de la solución de fosfato trisódico y se le adicionaron 20 mL de la solución de cloruro de cobre en agitación constante. La suspensión fue centrifugada por 5 min a 6000 rpm, el precipitado fue lavado dos veces por resuspensión en solución de tetraborato de sodio, seguido por centrifugación. Por último el precipitado fue suspendido en 100 mL de solución de tetraborato de sodio y se adicionaron 6 g de NaCl.

Procedimiento

Blanco para curva de calibración: se tomaron 5 mL de solución de tetraborato de sodio que contenía 6 g de NaCl en 100 mL, se le adicionaron 5 mL de agua destilada, se tomaron 9.5 mL y se disolvieron 200 mg de Glicina.

Curva de calibración: se preparó una solución madre de Glicina a 3000 ppm y a partir de ella se prepararon soluciones diluidas de las siguientes concentraciones 375 – 750 – 1125 – 1500 – 1875– 2250 – 2625 ppm. A 10 mL de cada solución estándar fueron adicionados 10 mL de suspensión de fosfato de cobre en balón de 50 mL, se llevo a volumen final con agua destilada. La suspensión fue agitada ocasionalmente durante 5 min y centrifugada 5 min a 6000 rpm. Se tomaron 9.5 mL de sobrenadante y se le adicionaron 200 mg de glicina.

Para la selección de la longitud de onda se realizó un barrido con una solución estándar de glicina a 3000 ppm, adicionado con 200 mg entre 450 – 700 nm [44].

El cálculo de la concentración de los aminoácidos es igual a la concentración en un complejo de cobre por dos, ya que la formula empírica de las sales de cobre que forman los aminoácidos es CuA_2 , donde A= 1 molécula de aminoácido.

Nota: se debió de tener cuidadoso control con el pH de los hidrolizados, el cual debía de estar en 7 a la hora de realizar los análisis.

8.7 Formulación de fertilizante foliar líquido

Basados en los requerimientos mínimos exigidos por la ICA, a la norma técnica Colombiana (NTC 5167) y de acuerdo a las formulaciones que se encuentran en el mercado, se propone el formulado de la Tabla 4.

Tabla 4. Formulación de fertilizante

Componente	Concentración (g/L)
Aminoácidos libres	50
Nitrógeno total (N)	150
Magnesio (Mg)	2.5
Cinc (Zn)	1.6
Hierro (Fe)	1.0
Manganeso (Mn)	0.55
pH en solución al 10 %	5.5-6.5
Fósforo (P ₂ O ₅)	50
Potasio (K ₂ O)	100

En la elección de los micronutrientes para la formulación del fertilizante foliar líquido se tuvo en la cuenta su función específica en el crecimiento de la planta, en la producción alimentaria y el hecho de que un nutriente no puede ser sustituido por otro. Como por ejemplo los micronutrientes como el cinc, hierro y manganeso son necesarios en pequeñas cantidades, pero imprescindibles para la vida de la planta. Forman parte de la clorofila e influyen en la actividad de las enzimas, lo que hace a las plantas crecer más sanas y resistentes frente a las plagas y enfermedades.

Posterior a la formulación del fertilizante foliar a base de aminoácidos producto de la hidrólisis ácida de la membrana de la cáscara de huevo se realizó una cuantificación del contenido de nitrógeno total por el método Kjeldahl según la norma NTC 370, el carbono orgánico oxidable total se determinó a través de una técnica titulométrica según la norma NTC 5167, el fósforo total expresado como P₂O₅ se determinó a través de una técnica espectrofotométrica según la NTC 234, el pH (10%) se determinó a través de una técnica potenciométrica según la NTC 5167, el calcio total expresado como CaO se determinó a través de Electroforesis capilar, el magnesio total expresado como MgO se determinó por Electroforesis capilar, el potasio total expresado como K₂O se determinó por electroforesis

capilar, el hierro total y el manganeso total se determinaron por absorción atómica, según la norma SM 3111B. Todos los análisis se realizaron según la metodología del Grupo Interdisciplinario de Estudios Moleculares (GIEM).

8.8 Evaluación de la eficiencia del fertilizante formulado en un cultivo modelo

Se sembró en materas plásticas (59 cm de largo x 13 cm de alto x 12 cm de ancho) (Figura 7), con una capacidad de 4 kg; con tierra de vivero abonada suplementado con gallinaza compostada en el punto de siembra. Se sembraron 3 semillas de frijol en cada tres puntos por matera. A cada matera se le asignó una concentración de hidrolizado 0.1 %, 0.2 % y 0.4 %. Estos resultados como se mencionó en el numeral 8.5 se compararon con dos testigos, el primero es un fertilizante foliar comercial con aminoácidos libres en su formulado (Tabla 5) y en el segundo sin fertilización.



Figura 6. Foto de matera plástica y sus dimensiones

La fase de experimentación se llevó a cabo en un lugar cubierto por un plástico transparente en el cual puede penetrar la luz, más no la lluvia por tanto el riego fue según las condiciones climáticas (Figura 7).



Figura 7. Condiciones de la fase experimental

Especificaciones del frijol usado en el análisis de eficacia

Variedad: frijol cargamanto macho

Pureza 98 %

Germinación mínima 80 %

Lote cc 05-10

Análisis 10/16

Tabla 5. Composición del fertilizante comercial A-MICSUR

COMPOSICIÓN A-MICSUR			
Aminoácidos libres	102.40 g/L	Cobre (Cu)	0.36 g/L
Carbono orgánico oxidable	187.00 g/L	Hierro (Fe)	0.66 g/L
Nitrógeno total (N)	140.80 g/L	Manganeso (Mn)	0.48 g/L
Nitrógeno orgánico (N)	140.80 g/L	Molibdeno (Mo)	0.06 g/L
Fósforo asimilable (P ₂ O ₅)	39.60 g/L	Zinc (Zn)	0.65 g/L
Potasio soluble en agua (K ₂ O)	84.40 g/L	pH en disolución al 10%	7.23
Boro (B)	0.1 g/L	Densidad a 20 °C	1.28 g/cc

La aplicación del fertilizante se hizo por aspersión con buena cobertura de la planta en tres etapas, la primera en prefloración, la segunda se hace después de un mes de la floración y la tercera aplicación, dos meses después de la floración.

Se aplicaron 30 mL de fertilizante foliar formulado a base del hidrolizado de la membrana de la cáscara de huevo y del fertilizante foliar comercial a base de aminoácidos por aspersión y en las horas de la mañana.

El fertilizante foliar comercial se diluyó según las especificaciones del fabricante de 1 L /hectárea, para la dilución se tomaron 0.05 mL del fertilizante y se diluyeron hasta 1 L con agua potable.

La eficacia del fertilizante se determinó a través de la biomasa de todas las partes de la planta de frijol, se pesaron las raíces, tallos, hojas, vainas y frutos.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 Proceso de separación

Para la optimización del proceso de separación de la membrana de la cáscara de huevo, se evaluaron el proceso mecánico, químico y la mezcla de ambos, encontrándose mejores resultados para la mezcla de ambos métodos. El método químico a través del tratamiento ácido ayudó a eliminar los remanentes de cáscara de huevo presentes en la membrana por medio de la disolución del carbonato de calcio, mientras que el método mecánico comparado con el químico es más eficiente y a demás tiene la ventaja de no disolver el carbonato de calcio, el cual es el componente principal de la cáscara de huevo. Por lo tanto al usar el método mecánico se pueden aprovechar tanto la membrana como la cáscara de huevo para diferentes aplicaciones.

A través de la implementación de las dos metodologías de separación de la membrana de la cáscara de huevo se obtuvo una eficiencia del 95.5 %

9.2 Caracterización de la membrana

En la Tabla 6, se puede observar el análisis proximal de la membrana de la cáscara de huevo. La cual incluye la cuantificación del contenido de proteína presente en la membrana de la cáscara de huevo de 63.4 %, al comparar este valor con la literatura se encuentra que es de 69.2 % [9], mostrando que aunque los valores no son iguales para ambos casos se observa un alto contenido de proteína, haciendo de esta un buen candidato para diversas aplicaciones, entre ellas la obtención de los aminoácidos libres a partir de hidrólisis química.

En cuanto al contenido de humedad y capacidad de retención de agua, estos valores son considerados en el momento de la hidrólisis en el cual se debe de hacer la relación membrana / volumen de ácido.

El contenido de cenizas de un 10.3 % en la membrana esta mas bajo con el reportado en la literatura, en el cual se encontró un 27.2 %.

Tabla 6. Caracterización de la membrana

Caracterización	Experimentales (%)
Proteína (N * 6,25)	63.4
Humedad	10.6
Cenizas	10.3
Grasas	0.5
Capacidad de retención de agua	458

9.3 Hidrólisis de proteína

La selección de cada uno de los ácidos se realizó considerando que podría ser útil el aporte de alguno de sus elementos en la formulación del fertilizante, como el aporte de nitrógeno proveniente del ácido nítrico, el aporte de fósforo proveniente de ácido fosfórico y el aporte de azufre proveniente del ácido sulfúrico. Como referencia para estas hidrólisis se usó el ácido clorhídrico ya que según la literatura es el ácido más empleado.

El hidrolizado se neutraliza con una base fuerte (hidróxido de sodio concentrado) con el fin de realizar los ensayos respectivos.

9.4 Grado de hidrolisis

El hidrolizado ácido de la proteína presente en la membrana de cáscara huevo alcanzó un grado de hidrólisis (GH) de 98.8 % con el ácido clorhídrico y 80.6 % con el ácido sulfúrico, lo cual confirmaría aun más el hecho de que estos ácidos son los más apropiados para la hidrólisis ácida y que los parámetros seleccionados para dicha hidrólisis fueron los adecuados.

En la determinación del grado de hidrólisis se determinó el contenido de nitrógeno total para el hidrolizado con HCl de 1.545 % y para el hidrolizado con H₂SO₄ de 2.463 %.

A demás se determino de una forma cualitativa el grado de hidrolisis de la proteína a través de reacciones características para la identificación de aminoácidos y proteínas como se puede observar en la Tabla 7.

Tabla 7. Reconocimiento de aminoácidos y proteínas.

Ácido	Biuret	Ninhidrina	Xantoprotéica	Azufrados
HCl	Azul cielo	Azul-purpura	Anaranjado	Negro
H ₃ PO ₄	Violeta claro	Azul-purpura	Anaranjado	Negro
H ₂ SO ₄	Azul cielo	Azul-purpura	Anaranjado	Negro
HNO ₃	Azul cielo	Azul-purpura	Anaranjado	Negro

La prueba de Biuret es negativa para la hidrólisis con ácido fosfórico, lo cual indica que la hidrólisis no fue completa. Para los demás ácidos es una prueba positiva confirmando que hubo una hidrólisis total.

La prueba de ninhidrina fue positiva para todas las hidrólisis, lo cual indica la presencia de α -aminoácidos.

Reacción Xantoprotéica fue positiva para todas las hidrólisis, indicando la presencia de aminoácidos aromáticos como: fenilalanina, tirosina o triptófano.

Reacción de aminoácidos azufrados fue positiva para todas las hidrólisis, indicando la presencia de aminoácidos que contengan azufre, como es el caso de la cisteína y metionina.

Espectros de masas

Figura 8. Espectro de masas del hidrolizado con HCl

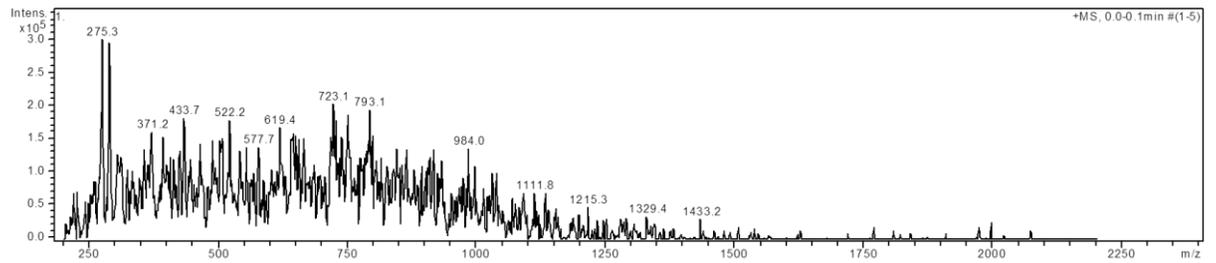


Figura 9. Espectro de masas de hidrolizado con H₂SO₄

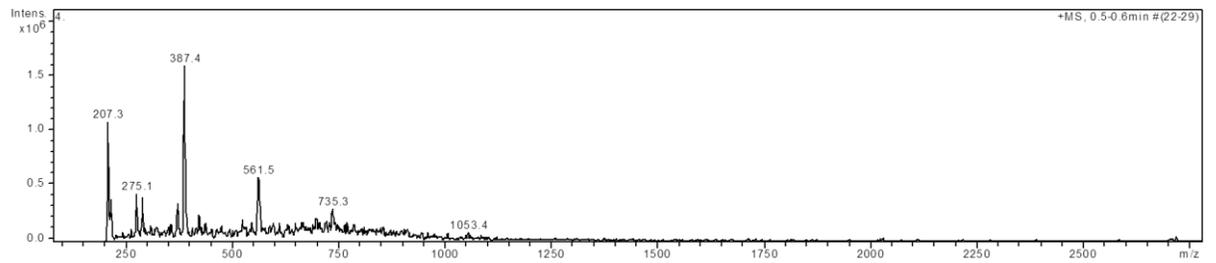


Figura 10. Espectro de masas del hidrolizado con H₃PO₄

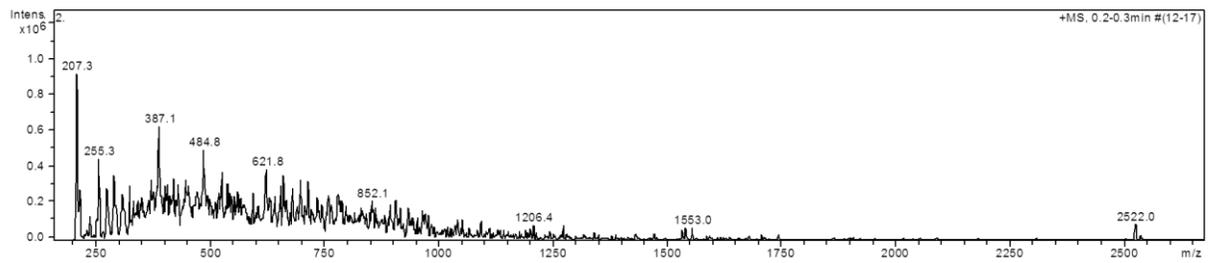
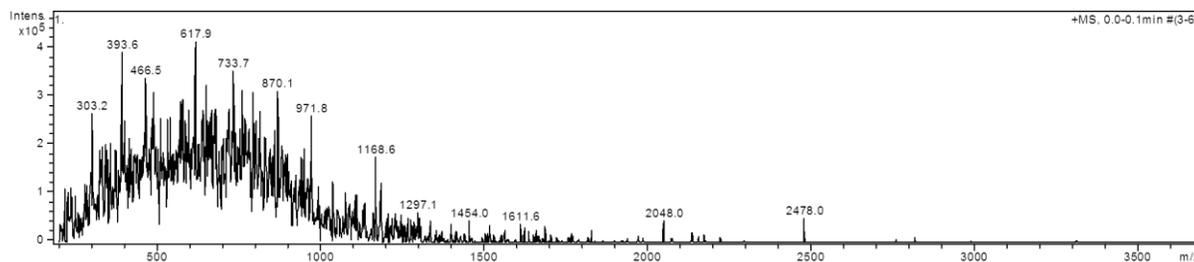


Figura 11. Espectro de masas hidrolizado con HNO₃



Como se puede observar en las figuras de la 9 hasta la 12 los espectros de masas confirman la presencia de picos con pesos moleculares menores a una proteína para todas las hidrólisis evaluadas, por lo tanto se puede inferir la presencia de péptidos de bajo peso molecular. Aunque este análisis no es concluyente a la hora de elegir a partir de que ácido se obtuvo la mejor hidrólisis y la identificación de los aminoácidos libres, da un indicio de la capacidad que tiene cada ácido para hidrolizar la proteína.

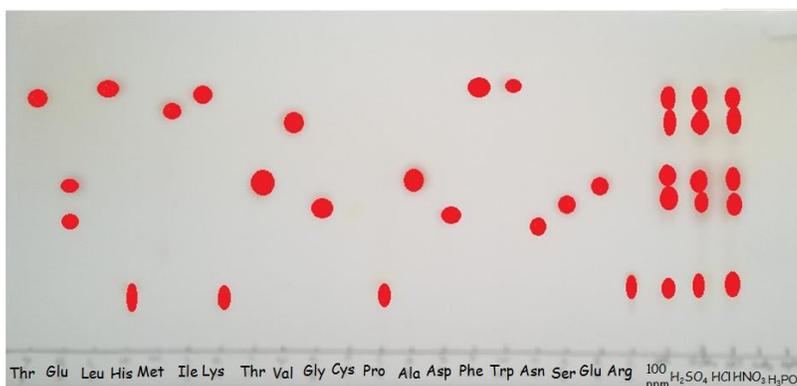


Figura 12. Placa Cromatográfica de todos los hidrolizados comparado con cada estándar de aminoácido y una mezcla de la misma a 100 ppm.

De las diferentes fases móviles evaluadas, se obtuvo una mejor separación con la mezcla 3:1:1 2-Butanol: Ácido acético glacial: Agua.

Se puede observar en las placas Cromatográficas que los hidrolizados con HCl y H₂SO₄ tienen un comportamiento muy similar al de la muestra patrón (mezcla de aminoácidos a 100 ppm), (Figura 13) caso opuesto con los hidrolizados realizados con H₃PO₄ y HNO₃ donde no fue posible observar ningún punto que indique la presencia de aminoácidos. De

estos resultados se puede concluir que los mejores hidrolizados son obtenidos usando HCl y H₂SO₄, los resultados observados con los ácidos H₃PO₄ y HNO₃ sugieren una mala hidrólisis, lo cual verifica la prueba positiva de Biuret para H₃PO₄ o que ambos ácidos no son lo suficientemente eficientes para hidrolizar la proteína.

Como se puede observar en la figura 14, al disminuir la concentración del ácido clorhídrico y del ácido sulfúrico, cualitativamente no se pudieron observar diferencias significativas en los hidrolizados de las concentraciones evaluadas, esto es debido a que los hidrolizados para las concentraciones al 1.5 y 3 M, fueron concentrados a través de la liofilización.

Al no observar diferencias cualitativas se realizó una cuantificación de la proteína presente en los hidrolizados por el método cuantitativo de Biuret en el cual la intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad de proteínas y se usó como estándar para la construcción de la curva de calibración albumina de suero bovino. Por lo tanto se pudo concluir que al disminuir la concentración de los ácidos, disminuyó el grado de hidrólisis de la proteína.

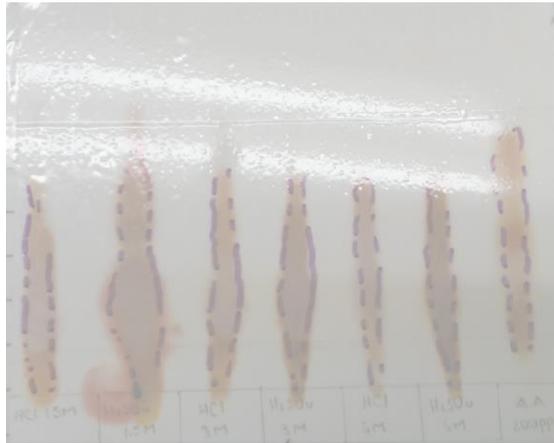


Figura 13. Placa Cromatográfica de todos los hidrolizados a las diferentes concentraciones comparado con una mezcla estándares de aminoácidos a 200 ppm

9.5 Pruebas de fitotoxicidad

Como se puede observar en la figura 15 y 16, no hubo germinación para los hidrolizados de HCl y H₂SO₄ a las siguientes concentraciones 100 - 75 - 50 - 25 %, comparado con el control el cual tuvo un porcentaje de germinación del 100 %. Por lo tanto se puede concluir que a estas concentraciones ambos hidrolizados son fitotóxicos.

Se procedió a preparar nuevas diluciones de ambos hidrolizados a las siguientes concentraciones 25 - 12.5 - 6.25 - 3.2 %.

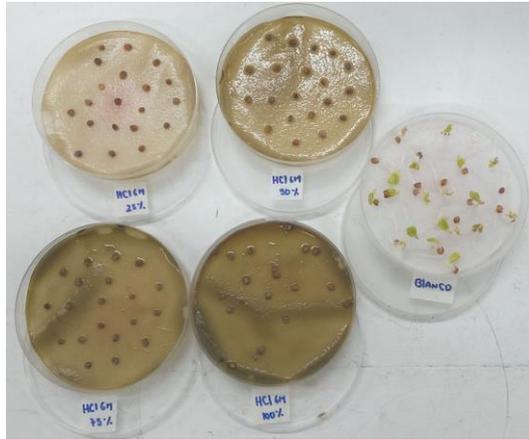


Figura 14. Germinación para hidrolizado con HCl 6 M (100 - 75 - 50 - 25 %)

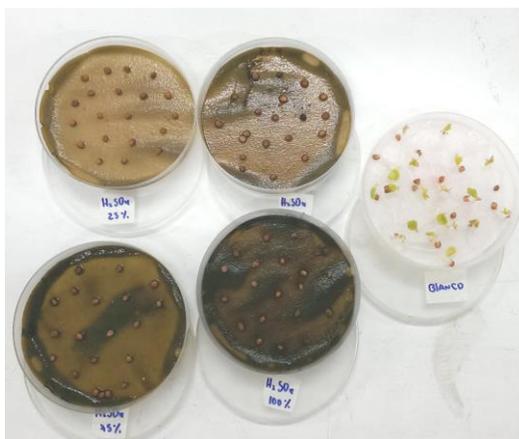


Figura 15. Germinación para hidrolizado con H₂SO₄ 6 M (100 - 75 - 50 - 25 %)

Como se puede observar en las Figura 17, para el hidrolizado con HCl 6 M solo se comienza a obtener germinación a una concentración del 12.5 % para las demás concentraciones mayores a esta se observa que el hidrolizado sigue siendo fitotóxico.

El índice de germinación para las diferentes concentraciones fue el siguiente: 15 % para la concentración de 12.5 %, 70 % para la concentración de 6.25 % y 90 % para la concentración de 3.2 %. Los resultados son comparados con el blanco el cual tiene un IG de 100 %.

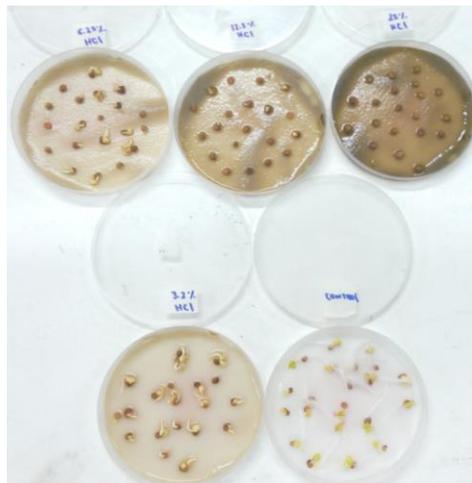


Figura 16. Germinación para hidrolizado con HCl 6 M (25 – 12.5 – 6.25 – 3.2 %)

Como se puede observar en la Figura 18, para el hidrolizado con H₂SO₄ 6 M comenzó la germinación para la concentraciones menores a de 6.25 %, para las concentraciones superiores sigue presentándose fitotóxicidad del hidrolizado.

El índice de germinación para las diferentes concentraciones fue el siguiente: 75 % para la concentración de 6.25 % y 80 % para la concentración de 3.2 %. Los resultados son cercanos al blanco el cual tiene un índice de germinación de 100 %.

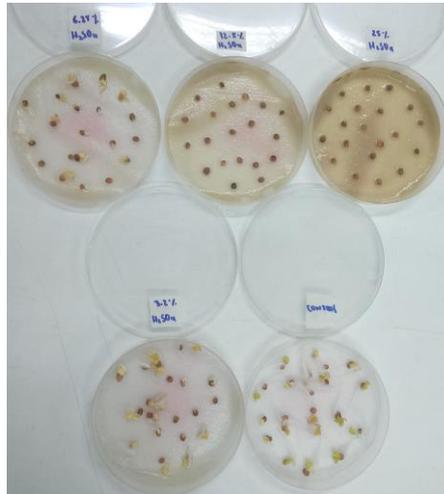


Figura 17. Germinación para hidrolizado con H_2SO_4 6 M (25 – 12.5 – 6.25 – 3.2 %)

Para el hidrolizado con HCl 6 M se procede a realizar diluciones de 12.5 – 6.25 – 3.2 – 1.6 – 0.8 % y para el hidrolizado con H_2SO_4 6 M se realizaron diluciones de 6.25 – 3.2 – 1.6 – 0.8 – 0.4 %. Estas diluciones se realizaron con el fin de encontrar a que concentración se obtienen resultados similares al blanco, lo cual implicaría que a esa concentración no hay efecto fitotóxico causado por los hidrolizados.

Como se puede observar en la Figura 19, a medida que se disminuyó la concentración del hidrolizado, hubo una mayor germinación de las semillas de rábano.

El índice de germinación para las diferentes concentraciones del hidrolizado con HCl 6 M fue el siguiente: 32 % para la concentración de 6.25 %, 80 % para la concentración de 3.2 %, 100 % para una concentración de 1.6 % y 100 % para una concentración de 0.8%. Los resultados son comparados con el blanco el cual tiene un índice de germinación de 95 %. Dado que se obtuvo un índice de germinación muy similar al control para varias concentraciones se procedió a analizar la longitud de la radícula.

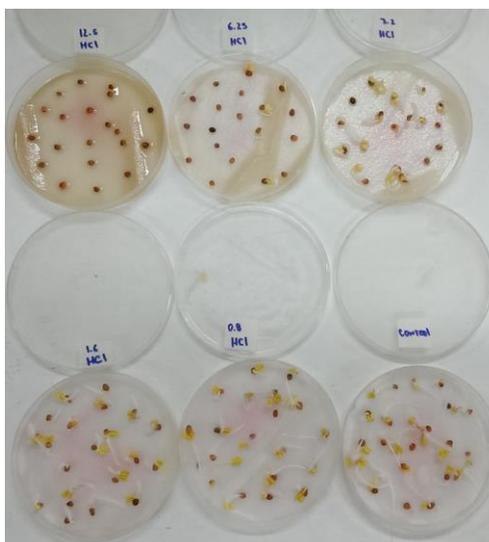


Figura 18. Germinación para hidrolizado con HCl 6 M (12.5 – 6.25 – 3.2 - 1.6 – 0.8 %)

Como se puede observar en la Figura 20, se puede ver un comportamiento similar del hidrolizado con H_2SO_4 , en el cual a medida que se disminuyó la concentración del hidrolizado, hubo una mayor germinación de las semillas de rábano.

El índice de germinación para las diferentes concentraciones del hidrolizado con H_2SO_4 6M fue el siguiente: 85 % para la concentración de 6.25 %, 95 % para la concentración de 3.2 %, 95 % para una concentración de 1.6 %, 95 % para una concentración de 0.8 % y 100 % para una concentración de 0.4 %. Los resultados son comparados con el blanco el cual tiene un índice de germinación de 95 %. Dado que se obtuvo un índice de germinación muy similar al blanco para varias concentraciones se procedió a medir la longitud de la radícula.

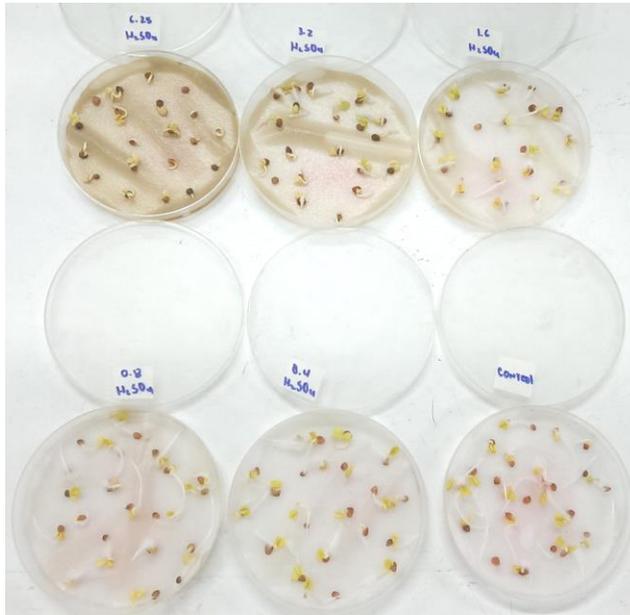


Figura 19. Germinación para hidrolizado con H_2SO_4 6 M (6.25 – 3.2 – 1.6 – 0.8 – 0.4 %)

En la medición de la longitud de las radículas se puede observar aun un efecto fitotóxico de los hidrolizados a estas concentraciones comparado con el blanco (Figura 21), por lo tanto se debe evaluar una concentración menor de ambos hidrolizados.

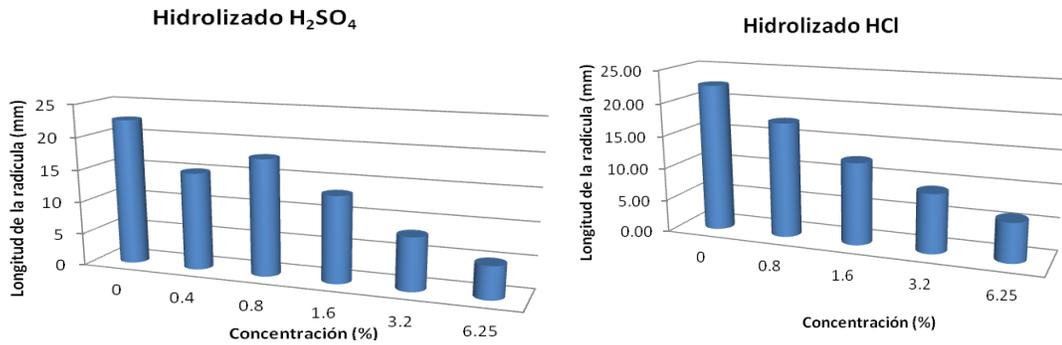


Figura 20. Efecto de los hidrolizados a diferentes concentraciones sobre *R. sativus*

Del análisis estadístico realizado, se puede concluir que para la única concentración en la que no se observó una diferencia estadísticamente significativa, comparada con el blanco a un nivel de confianza de 95 %, fue para el hidrolizado con H_2SO_4 al 0.8 %. Para todas las

demás concentraciones se observaron diferencias estadísticamente significativas a un valor $p < 0.05$.

Por lo anterior se procedió a evaluar los hidrolizados a las siguientes concentraciones 1.6 – 0.8 – 0.4 – 0.2 %, donde se encontró un índice de germinación de 95 % para el blanco, para el hidrolizado con H_2SO_4 a la diferentes concentraciones (Figura 22) se encontró un índice de germinación de 85 % para la concentración al 0.2 %, 90 % para la concentración al 0.4 %, 75 % para la concentración al 0.8 % y 100 % para la concentración al 1.6 %.

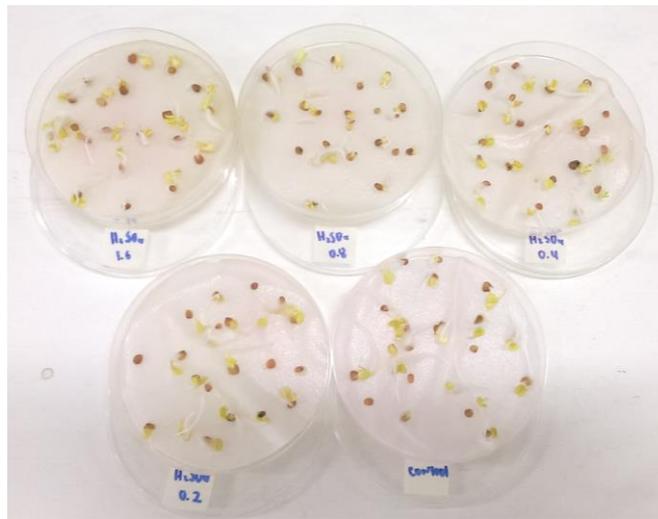


Figura 21. Germinación para hidrolizado con H_2SO_4 6 M (1.6 – 0.8 – 0.4 – 0.2 %)

Para el hidrolizado con HCl se obtuvieron los siguientes índices de germinación (Figura 23), 100 % para la concentración al 0.2 %, 90 % para la concentración al 0.4 %, 95 % para la concentración al 0.8 % y 95 % para la concentración al 1.6 %.

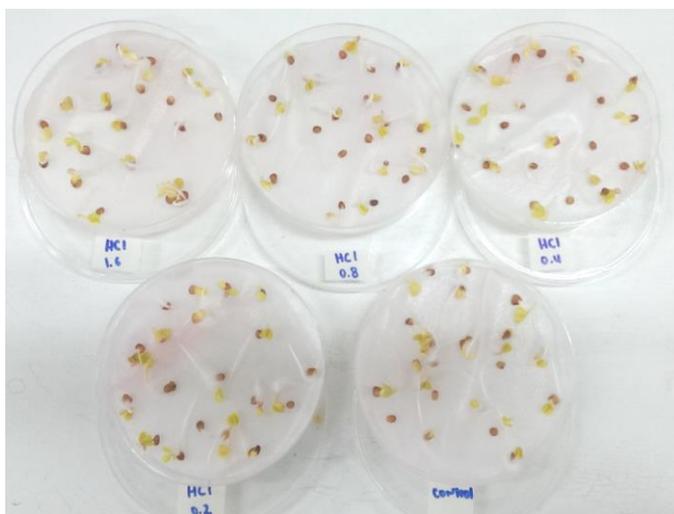


Figura 22. Germinación para hidrolizado con HCl 6 M (1.6 – 0.8 – 0.4 – 0.2 %)

Al comparar los índices de germinación se puede observar que son similares al blanco, a excepción del hidrolizado con H_2SO_4 a 0.4 % el cual tuvo un índice de germinación más bajo. Por lo tanto se procedió a medir la longitud de la radícula para todas las concentraciones de los hidrolizados y compararlas con el blanco (Figura 24).

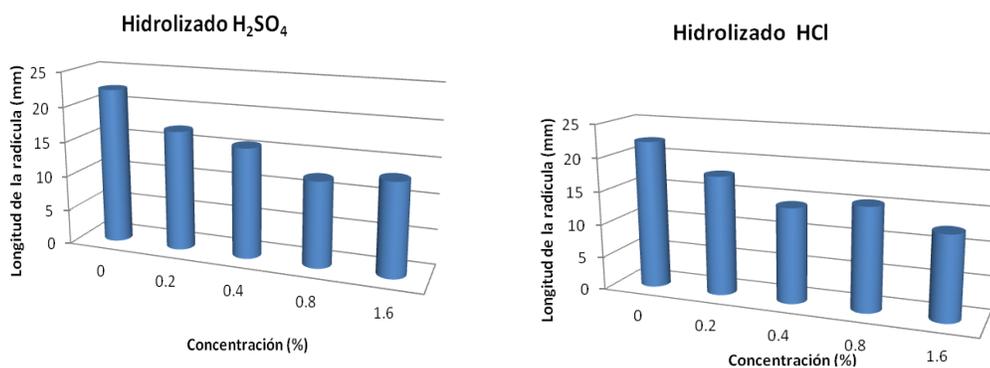


Figura 23. Efecto de los hidrolizados a diferentes concentraciones sobre *R. sativus*.

Al realizar el análisis estadístico de las medias de la longitud de la radículas de los hidrolizados al 0.2 % de concentración con la media del blanco a un nivel de confianza del 95%, se determinó que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias para el hidrolizado con HCl a un valor $p = 0.083$. Mientras que para el hidrolizado

con H₂SO₄ se encontró que si hay diferencias estadísticamente significativas entre las medias con un valor p= 0.039.

Para las concentraciones iguales y mayores al 0.4 % de ambos hidrolizados se encontró que si habian diferencias estadísticamente significativas entre las medias a un nivel de confianza del 95 %, con un valor p< 0.05.

Por lo tanto se realizarón diluciones por triplicado de ambos hidrolizados a 0.4 – 0.2 – 0.1 %, para observar si a esta concentración no hay ningun efecto fitotóxico por parte de ambos hidrolizados.

Para el hidrolizado con H₂SO₄ se encontró un índice de germinación de 90 % para la concentración de 0.4 %, 100 % para una concentración de 0.2 % y un 95 % para una concentración de 0.1 %.

Para el hidrolizado con HCl se encontró un índice de germinación de 95 % para la concentración de 0.4 %, 90 % para una concentración de 0.2 % y un 95 % para una concentración de 0.1 %, ambos hidrolizados se compararon con el blanco con un índice de germinación de 95 %.

Al medir la longitud de la radícula de ambos hidrolizados como se observa en la figura 25, se pueden apreciar mejor las diferencias y compararlas con el blanco.

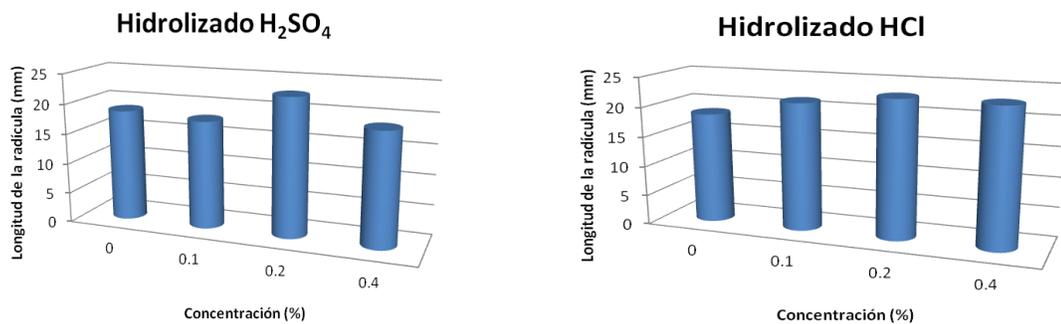


Figura 24. Efecto de los hidrolizados a diferentes concentraciones sobre *R. sativus*.

Al realizar el analisis estadístico de las medias de la longitud de la radículas de los hidrolizados al 0.1 % de concentración con la media del blanco a un nivel de confianza del 95 %, se determinó que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las

medias para el hidrolizado con H₂SO₄ con un valor p = 0.1621. Para el hidrolizado con HCl se encontró que tampoco hay diferencias estadísticamente significativas entre las medias con un valor p= 0.1612.

Para las concentraciones al 0.2 % de ambos hidrolizados se encontró que no habian diferencias significativas a un nivel de confianza de un 95 %, para el el hidrolizado con H₂SO₄ se encontro un valor p= 0.2595 y para el hidrolizado con HCl se encontro un valor p= 0.1706.

Para las concentraciones al 0.4 % de ambos hidrolizados se encontró que no habian diferencias significativas a un nivel de confianza de un 95 %, para el el hidrolizado con H₂SO₄ se encontro un valor p= 0.9591 y para el hidrolizado con HCl se encontro un valor p= 0.07545.

Con estos resultados podemos concluir que para las concentraciones menores a 0.4 % no hay efecto fitotóxico de ambos hidrolizados en el modelo *Raphanus sativus*.

Cuantificación de aminoácidos

Se determinó que el máximo de absorción del complejo de cobre de glicina, adicionado con glicina fue de 630 nm.

La cuantificación de los aminoácidos libres presentes en los hidrolizados de la proteína de la membrana de la cáscara de huevo fue determinada por el análisis espectrofotométrico con sus sales de cobre, en el cual se encontró una correlación lineal entre la absorbancia y la concentración de aminoácidos, esta correlación se representa a través de la ecuación $Y = a + b \cdot X$ donde y es la absorbancia y x es la concentración en M.

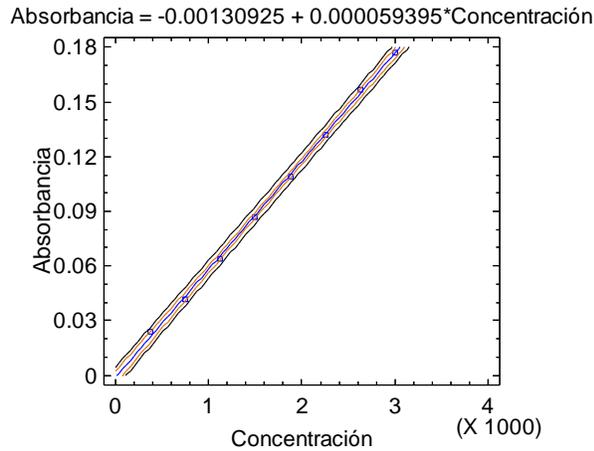


Figura 25. Curva de calibración para la cuantificación de aminoácidos

El coeficiente de correlación igual a 0.999441, indica una relación relativamente fuerte entre las variables.

De la figura 26, se puede observar la curva de calibración para la cuantificación de los aminoácidos libres totales a partir del complejo de cobre-glicina, a través de esta curva se pudo interpolar la concentración de los aminoácidos libres presentes en los diferentes hidrolizados.

El complejo de cobre-aminoácidos presenta un color azul y a través de la intensidad del color fue posible estimar la concentración. En la tabla 8, se puede observar el contenido de aminoácidos libres de los hidrolizados realizados con HCl 6 M y H₂SO₄ 6 M, a partir de esta información se pudo conocer la concentración final a la cual los hidrolizados no se presentan un efecto fitotóxico en los modelos biológicos evaluados y la concentración final en el fertilizante foliar.

Tabla 8. Contenido de aminoácidos libres en hidrolizados

Hidrolizados 6 M	% equivalente de glicina
HCl	18.7
H ₂ SO ₄	22.4

A demás se pudo corroborar que los hidrolizados de la proteína realizados con HCl y H₂SO₄ 6 M, tienen una alta eficiencia, comparado con el ácido nítrico y fosfórico.

9.6 Formulación del fertilizante foliar líquido

En la formulación del fertilizante foliar se emplearon sales con alta solubilidad, bajo costo y accesibilidad. En la Tabla 9 se pueden observar las sales usadas y la composición del elemento y su solubilidad.

Tabla 9. Fuente de componentes para la formulación del fertilizante foliar

Componente	Fuente	Aporte (%)	Solubilidad a 20 °C	Referencia
Nitrógeno (N)	CO(NH ₂) ₂	46	1.080 g/L	[45]
Magnesio (Mg)	MgSO ₄	9.8	252 g/L	[46]
Cinc (Zn)	ZnSO ₄ • 7H ₂ O	22	960 g/L	[47]
Hierro (Fe)	FeSO ₄ • 7H ₂ O	20	400 g/L	[48]
Manganeso (Mn)	MnSO ₄ • H ₂ O	30	393 g/L	[49]
Fósforo (P)	(NH ₄) ₂ HPO ₄	46	588 g/L	[50]
Potasio (K)	KCl	60	330 g/L	[51]

En la Tabla 10. Se puede observar la caracterización fisicoquímica de los fertilizantes foliares, formulados a base de aminoácidos libres producto de la hidrólisis ácida (HCl y H₂SO₄) de la membrana de cáscara de huevo.

Tabla 10. Caracterización fisicoquímica de los fertilizantes foliares formulados

Parámetro	Expresado como	HCl (ppm)	H₂SO₄ (ppm)	Referencia (ppm)
Nitrógeno	N	12620	13800	150000
Aminoácidos libres	A.A Glicina	52800	51100	50000
Magnesio	MgO	106.08	51.24	2500
Cinc	Zn	26.4	25.0	1600
Hierro	Fe	73.31	206.48	1000
Manganeso	Mn	1.47	4.34	550
Fósforo	P ₂ O ₅	19600	18700	50000
Potasio	K ₂ O	84039.2	54654.6	100000
Calcio	CaO	265.87	457.43	-
Sodio	Na	140.05	267.46	-
Carbono orgánico oxidable total	No aplica	28800	24100	-
pH (10%)	No aplica	6.6	6.8	5.5 - 6.5

Al realizar la comparación de los valores de referencia o esperados en la formulación final de los fertilizantes foliares a base de aminoácidos libres, obtenidos a partir de la hidrólisis ácida (HCl –H₂SO₄) de la proteína presente en la membrana de la cáscara de huevo, se puede observar que el valor de la concentración de los micronutrientes y macronutrientes se alejan significativamente del valor de concentración esperado. Pero los resultados cumplen con el mínimo valor de concentración la norma establecida por el ICA para fertilizantes foliares por lo tanto, ambos formulados pueden ser usados como fertilizantes foliares.

Evaluación de la eficiencia del fertilizante formulado en un cultivo modelo

La evaluación de la eficiencia de los fertilizantes foliares obtenidos por medio del hidrolizado proteínico de la membrana de la cáscara de huevo, se realizó a través de la comparación de la biomasa total de cada tratamiento frente al (fertilizante foliar comercial a base de aminoácidos (A-MICSUR) (Figura 26), la biomasa total incluye raíz, tallo, hojas, vainas y frutos.

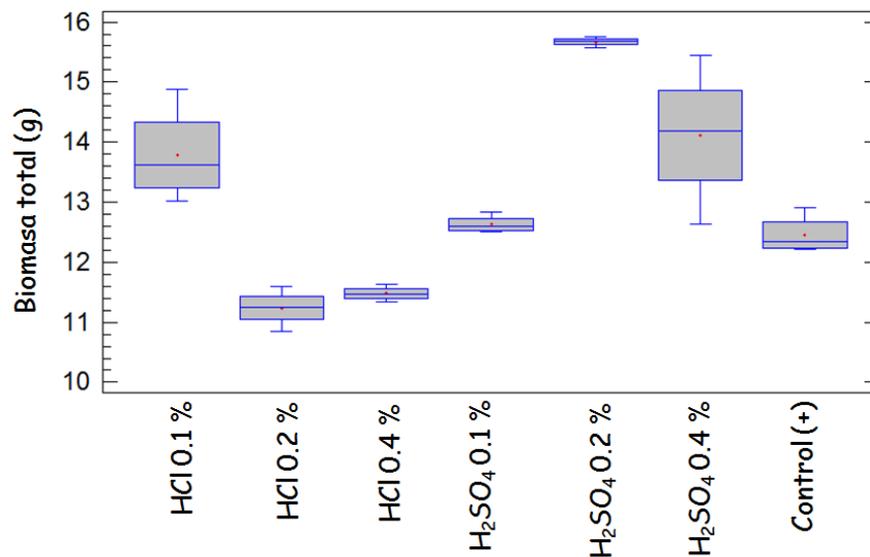


Figura 26. Biomasa total de cada tratamiento comparado con el control positivo (A-MICSUR).

A partir de la comparación de la biomasa total de los tratamientos frente al fertilizante foliar comercial se puede observar que el mejor resultado para el hidrolizado con ácido clorhídrico es al 0.1 % y para el hidrolizado con el ácido sulfúrico es al 0.4 % donde se pueden observar diferencias significativamente altas con respecto al control, por tanto se puede interpretar que los formulados a partir de los hidrolizados de la proteína tienen mayores beneficios en la producción de biomasa.

Con el fin de comparar el efecto en la producción de frutos, se evaluó la biomasa de los frutos de los dos tratamientos frente al control positivo como se puede observar en la

figuras 27. En la figuras 28 y 29 se observan las anovas de los mejores resultados con cada uno de los tratamientos al comparar con el blanco.

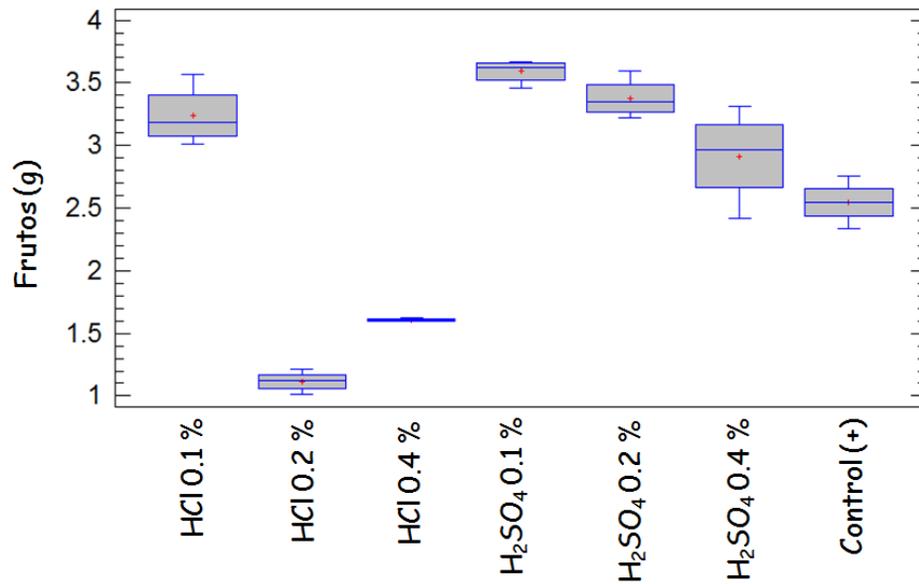


Figura 27. Biomasa total de cada tratamiento comparado con el control positivo (A-MICSUR).

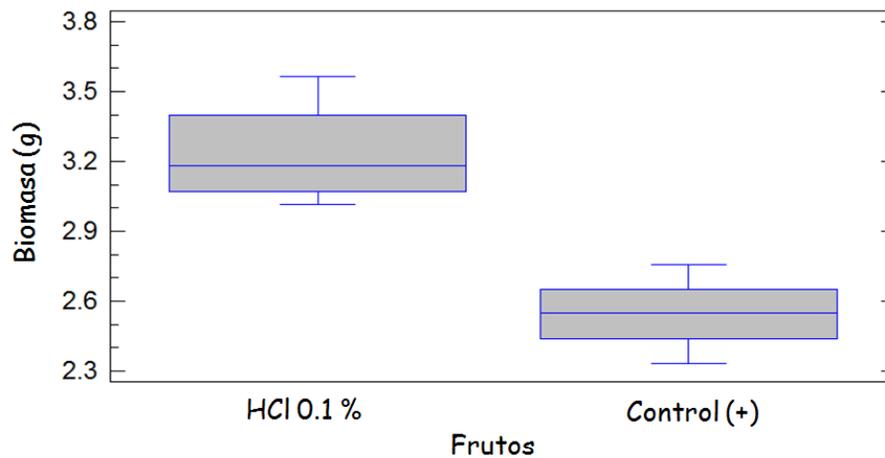


Figura 28. Biomasa de los frutos para el tratamiento con HCl comparado con el control positivo (A-MICSUR).

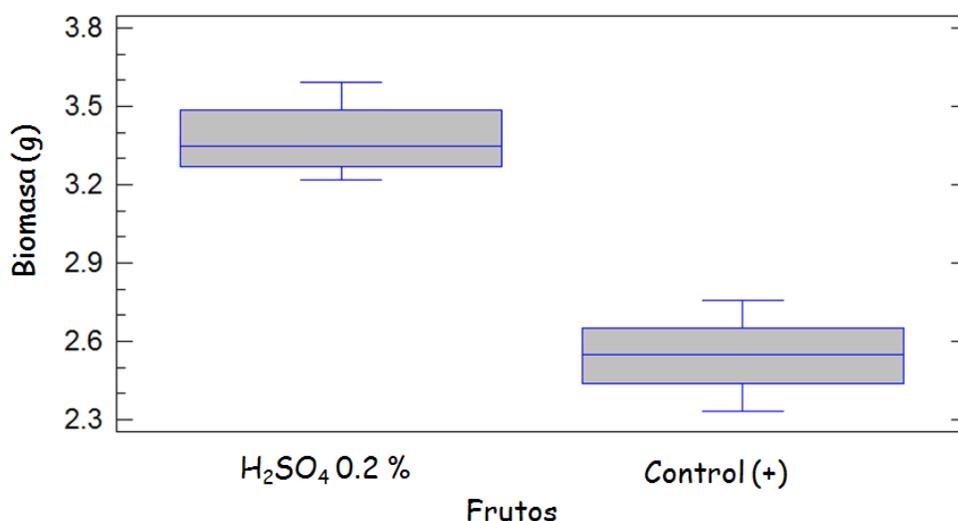


Figura 29. Biomasa de los frutos para el tratamiento con H₂SO₄ comparado con el control positivo (A-MICSUR).

En la figura 27 se puede observar que la mayor cantidad de biomasa de los frutos para el tratamiento con HCl fue al 0.1%, mientras que con el H₂SO₄ fue al 0.2%, lo cual está de acuerdo con la obtención de la biomasa total. Se puede observar en las figuras 28 y 29 a través de las anovas de cada uno de los tratamientos en los que se obtuvo la mayor producción de biomasa comparada con el control positivo unas diferencias altamente significativas, esto se ve reflejado en el valor p de cada tratamiento. Para el tratamiento con HCl 0.1 % asumiendo varianzas iguales se tiene un valor $t = 4.7$ y $p = 0.0033$ y para el tratamiento con H₂SO₄ 0.2 % asumiendo varianzas iguales se tiene un valor $t = 7.1$ y $p = 0.00039$.

Se puede inferir a través del análisis estadístico que los fertilizantes foliares obtenidos a partir del hidrolizado de la membrana de la cáscara de huevo es más eficaz que el fertilizante foliar comercial. Lo cual podría ser atribuido a los aminoácidos que hacen parte de la proteína presente en la membrana de la cáscara, donde se destaca el colágeno con una secuencia basada en glicina-prolina-hidroxiprolina, los cuales se ha encontrado que tienen una alta influencia en desarrollo de las plantas.

10. CONCLUSIONES

- A través de la implementación de la combinación de dos técnicas de separación, tanto física como química se obtuvo la mejor eficiencia de separación para la membrana de la cáscara de huevo.
- La hidrólisis de la membrana de la cáscara de huevo fue más efectiva con el ácido clorhídrico y con el ácido sulfúrico, comparado con el ácido nítrico y el ácido nítrico. Lo cual está de acuerdo con la literatura para el ácido clorhídrico, que señala este ácido como el convencional y más comúnmente empleado para la hidrólisis ácida.
- Las pruebas cualitativas para la identificación del grado de hidrólisis, mostraron ser útiles en la selección de las mejores condiciones de hidrólisis.
- Se obtuvo una alta concentración de los aminoácidos libres expresados como % de equivalente de glicina, obtenidos a partir de la hidrólisis ácida (HCl y H₂SO₄) de la membrana de la cáscara de huevo y el valor esperado para la formulación final de los fertilizantes foliares.
- A través de las pruebas de fitotoxicidad de los hidrolizados sobre *R. sativus*, se logró encontrar a que concentración no había efecto fitotóxico sobre este modelo biológico.
- Se formularon dos fertilizantes foliares a base de aminoácidos libres con concentraciones por debajo de lo esperadas, pero con los valores de concentración para los macronutrientes mayores a los mínimos valores establecidos por el ICA. Por lo tanto ambos formulados podrían ser usados como fertilizantes foliares.
- La prueba de eficacia de los formulados de los fertilizantes foliares a base de aminoácidos libres, en *P. vulgaris* mostró a través de la comparación de la biomasa total comparada con el control positivo, que los mejores tratamientos fueron obtenidos con HCl 0.1 % y H₂SO₄ 0.2 %. Los cuales tienen diferencias significativas comparadas con el control.

- La producción de frutos es estadísticamente diferente del control comparado con los tratamientos HCl 0.1 % y H₂SO₄ 0.2 %. Teniendo estos, un efecto estimulante mayor en la producción de frutos. lo cual se vio reflejado en las anovas de cada una de las comparaciones.
- La hidrólisis de materiales proteicos de desecho, es una gran estrategia de darles un valor agregado y aprovechar los recursos disponibles para obtener aminoácidos libres.

11. IMPACTO AMBIENTAL

Este proyecto presenta una de las mejores formas de valorizar un residuo avícola, dado que no solo indica el manejo de la cáscara evitando cualquier posible riesgo de bioseguridad, si no que nos propone la transformación y aprovechamiento de estos de tal forma que se conviertan en materia prima para otros procesos, reducción de costos de recolección, reducción del volumen de los residuos sólidos, se alarga la vida útil de los sistemas de relleno sanitario, mejora las condiciones medioambientales y de salubridad de las productoras y sus alrededores.

Además el aprovechamiento de este residuo en la formulación de un fertilizante, disminuye los efectos adversos que pueden causar a largo plazo los fertilizantes de síntesis química.

12. BIBLIOGRAFIA

- [1] P. O. Erwin, "Huevo el alimento de las generaciones colombianas," 2012. [Online]. Available: <http://www.eldiario.com.co/seccion/ECONOMICA/huevo-el-alimento-de-las-generaciones-colombianas121105.html>.
- [2] F. José and J. Benito, "Revalorización de subproductos en el sector de producción de huevos." [Online]. Available: https://www.google.com.co/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0CCsQFjAA&url=http://www.madrimasd.org/biotecnologia/Informes/Informes_GetFile.aspx?id=8900&orderid=0&ei=qit-U4yLAbOqsQS_2IDwCg&usg=AFQjCNHewPlknZDQhk8L3Mt4CY5eauUlrg.
- [3] M. Nasrollahzadeh, S. M. Sajadi, and A. Hatamifard, "Waste chicken eggshell as a natural valuable resource and environmentally benign support for biosynthesis of catalytically active Cu/eggshell, Fe₃O₄/eggshell and Cu/Fe₃O₄/eggshell nanocomposites," *Appl. Catal. B Environ.*, vol. 191, pp. 209–227, 2016.
- [4] G. Karoshi, P. Kolar, S. B. Shah, G. Gilleskie, and L. Das, "Calcined eggshell as an inexpensive catalyst for partial oxidation of methane," *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*, vol. 57, pp. 123–128, 2015.
- [5] S. Ramesh, A. N. Natasha, C. Y. Tan, L. T. Bang, S. Ramesh, C. Y. Ching, and H. Chandran, "Direct conversion of eggshell to hydroxyapatite ceramic by a sintering method," *Ceram. Int.*, vol. 42, no. 6, pp. 7824–7829, 2016.
- [6] S.-C. Wu, H.-C. Hsu, S.-K. Hsu, Y.-C. Chang, and W.-F. Ho, "Synthesis of hydroxyapatite from eggshell powders through ball milling and heat treatment," *J. Asian Ceram. Soc.*, vol. 4, no. 1, pp. 85–90, 2016.
- [7] O. A. A. Eletta, O. A. Ajayi, O. O. Ogunleye, and I. C. Akpan, "Adsorption of cyanide from aqueous solution using calcinated eggshells: Equilibrium and optimisation studies," *J. Environ. Chem. Eng.*, vol. 4, no. 1, pp. 1367–1375, 2016.
- [8] M. Pettinato, S. Chakraborty, H. A. Arafat, and V. Calabro', "Eggshell: A green adsorbent for heavy metal removal in an MBR system," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 121, pp. 57–62, 2015.
- [9] A. M. Kingori, "A-Review-of-the-uses-of-poultry-eggshells-and-shell Membranes." pp. 908–912, 2011.
- [10] D. a. Oliveira, P. Benelli, and E. R. Amante, "A literature review on adding value to solid residues: egg shells," *J. Clean. Prod.*, vol. 46, pp. 42–47, May 2013.
- [11] C. M. M. Cordeiro and M. T. Hincke, "Recent patents on eggshell: Shell and membrane applications," *Recent Patents on Food, Nutrition and Agriculture*, vol. 3, no. 1, pp. 1–8, 2011.
- [12] A. T. Santos¹ and y D. A. Manjarrez, "Fertilización foliar, un respaldo importante

- en el rendimiento de los cultivos.,” 2000. [Online]. Available: <file:///C:/Users/Laboratorio/Desktop/fertilizacionfoliarrespaldoimportante.pdf>.
- [13] E. L. A. S. L. S. Y. S, P. De, and S. MIOCÉNICAS, “Estudio de la spropiedades físicas y funcionales de un hidrolizado enzimático de proteína de Chocho a escala piloto y su aplicación como fertilizante.,” Escuela politécnica nacional, 2006.
- [14] W. T. Tsai, J. M. Yang, C. W. Lai, Y. H. Cheng, C. C. Lin, and C. W. Yeh, “Characterization and adsorption properties of eggshells and eggshell membrane.,” *Bioresour. Technol.*, vol. 97, no. 3, pp. 488–93, Feb. 2006.
- [15] X. Huang, Y. Zhou, M. Ma, Z. Cai, and T. Li, “Chemiluminescence evaluation of antioxidant activity and prevention of DNA damage effect of peptides isolated from soluble eggshell membrane protein hydrolysate.,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 58, no. 23, pp. 12137–42, Dec. 2010.
- [16] “Definición. DE.” [Online]. Available: <http://definicion.de/residuo/>.
- [17] “El reciclaje,” 2010. [Online]. Available: <http://elreciclaje.org/>.
- [18] Monografías de Medicina Veterinaria, “La cáscara del huevo: Un modelo de biomineralización,” 2000. [Online]. Available: http://web.uchile.cl/vignette/monografiasveterinaria/monografiasveterinaria.uchile.cl/CDA/mon_vet_simple/0,1420,SCID%3D18366%26ISID%3D452%26PRT%3D18364,00.html.
- [19] A. Schaafsma, I. Pakan, G. J. H. Hofstede, F. A. J. Muskiet, E. Van Der Veer, and P. J. F. De Vries, “Mineral , Amino Acid , and Hormonal Composition of Chicken Eggshell Powder and the Evaluation of its Use in Human Nutrition,” *Poult. Sci.*, vol. 79, pp. 1833–1838, 2000.
- [20] H. C. S.Hsieh, “Hydrogen peroxide treatment of eggshell membrane to control porosity,” *Food Chem.*, vol. 14, no. 3, pp. 2117–2121, 2013.
- [21] M. K. Sah and S. N. Rath, “Soluble eggshell membrane: A natural protein to improve the properties of biomaterials used for tissue engineering applications,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 67, pp. 807–821, 2016.
- [22] P. G. Ray and S. Roy, “Eggshell membrane: A natural substrate for immobilization and detection of DNA,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 59, pp. 404–410, 2016.
- [23] M. Arami, N. Yousefi Limaee, and N. M. Mahmoodi, “Investigation on the adsorption capability of egg shell membrane towards model textile dyes,” *Chemosphere*, vol. 65, no. 11, pp. 1999–2008, 2006.
- [24] B. Zheng, L. Qian, H. Yuan, D. Xiao, X. Yang, M. C. Paau, and M. M. F. Choi, “Preparation of gold nanoparticles on eggshell membrane and their biosensing application,” *Talanta*, vol. 82, no. 1, pp. 177–183, 2010.
- [25] B. Wu, G. Zhang, S. Shuang, and M. M. F. Choi, “Biosensors for determination of glucose with glucose oxidase immobilized on an eggshell membrane,” *Talanta*, vol. 64, no. 2, pp. 546–553, 2004.

- [26] M.-L. Chen, C.-B. Gu, T. Yang, Y. Sun, and J.-H. Wang, "A green sorbent of esterified egg-shell membrane for highly selective uptake of arsenate and speciation of inorganic arsenic," *Talanta*, vol. 116, pp. 688–694, 2013.
- [27] C. L. Y. Liu, "Comparison of eggshell membrane protein extracted effects by different methods," *Chinese Soc. Agric. Eng.*, vol. 30, no. 7, pp. 274–280, 2014.
- [28] M. Natalia, "Remedicación de metales pesados (Cd²⁺ y Zn²⁺) con CaCO₃ proveniente de la cáscara de huevo.," UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA, 2011.
- [29] J. M. Teijón, *Bioquímica estructural*. 2011.
- [30] M. Fountoulakis and H.-W. Lahm, "Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins," *J. Chromatogr. A*, vol. 826, no. 2, pp. 109–134, Nov. 1998.
- [31] A. Finck, *Fertilizantes y fertilización*. 1988.
- [32] A. R. Coca and E. L. Cardozo, "FERTILIZANTES LIQUIDOS A PARTIR DE MATERIALES," UNIVERSIDAD DE LA SABANA, 2002.
- [33] "BIONET ACTIVADOR." [Online]. Available: <http://www.bionetsrl.com/bionet-activador-fertilizante-a-base-de-aminoacidos.pdf>.
- [34] C. José, "Evaluación de la eficacia de cinco fertilizantes foliares con tres dosis en el cultivo establecido de alfalfa (," ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO, 2011.
- [35] G. Fátima, "Evaluación de la eficiencia de cuatro fertilizantes orgánicos foliares en tres dosis y dos épocas de aplicación en el rendimiento del cultivo de brócoli, en majají, cantón riobamba, provincia Chimborazo.," ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO, 2011.
- [36] D. Franco, J.A., Hernández, F.J. y Hernández, "Recuperación de cultivos de patata afectados por heladas mediante la aplicación de aminoácidos.," *Horticultura*, vol. 46, pp. 82–84, 1989.
- [37] P. A. Marín, "Formulaciones Insecticidas de Nicotina: Caracterización Estructural y su Efecto en la Actividad Biológica," Universidad de Antioquia, 2008.
- [38] F. A. • Foresman, E., *Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods.*, Segunda Ed. .
- [39] Mag, "Leguminosae," in *Aspectos Tecnicos sobre Cuarenta y Cinco Cultivos Agricolas de Costa Rica*, 1991, p. 9.
- [40] S. Yoo, J. S. Hsieh, P. Zou, and J. Kokoszka, "Utilization of calcium carbonate particles from eggshell waste as coating pigments for ink-jet printing paper," *Bioresour. Technol.*, vol. 100, no. 24, pp. 6416–6421, 2009.
- [41] S. Nilsang, S. Lertsiri, M. Suphantharika, and A. Assavanig, "Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases," *J. Food Eng.*, vol. 70, no. 4, pp. 571–578, 2005.
- [42] H. Wang, F. Zhang, J. Cao, Q. Zhang, and Z. Chen, "Comparison of Chromatographic and Titrimetric Methods for the Determination of the α -amino

- Nitrogen in Standard Solution and Fish Protein Hydrolysates,” *J. Food Res.*, vol. 1, no. 4, pp. 174–183, 2012.
- [43] C. G. Pope and M. F. Stevens, “The determination of amino-nitrogen using a copper method,” *Biochem. J.*, vol. 33, no. 7, pp. 1070–7, 1939.
- [44] C. Chambers and R. Spies, “Spectrophotometric analysis of amino acids and peptides with their copper salts.”
- [45] Fertiberia, “Catálogo de fertilizantes.” [Online]. Available: <http://www.fertiberia.com/media/217446/catalogo-fertilizantes-agricultura.pdf>.
- [46] I. INDUSTRIAL, “Sulfato de Magnesio Heptahidratado.” [Online]. Available: <http://www.aris.com.pe/quimicos/wp-content/uploads/2014/04/HT-Sulfato-de-Magnesio.pdf.pdf>.
- [47] Fertilizantes agralia, “Sulfato de Zinc Heptahidratado.” [Online]. Available: http://www.agralia.es/uploads/06_Seguridad/fichas_seguridad/FS_SULFATO_ZINC_HEPTAHIDRATO.pdf.
- [48] Precisagro, “Sulfato de hierro heptahidratado.” [Online]. Available: http://recintodelpensamiento.com/ComiteCafeteros/HojasSeguridad/Files/Fichas/FT_SulfatodeHierro2016527152815.pdf.
- [49] ARIS Industrial, “Sulfato de Manganeso monohidratado.” [Online]. Available: <http://www.aris.com.pe/quimicos/wp-content/uploads/2014/04/HT-Sulfato-de-Manganeso.pdf.pdf>.
- [50] IPNI, “Fuentes de Nutrientes Específicos.” [Online]. Available: [https://www.ipni.net/publication/nss-es.nsf/0/3D71CA0246B0EA8E85257BBA0059CD97/\\$FILE/NSS-ES-17.pdf](https://www.ipni.net/publication/nss-es.nsf/0/3D71CA0246B0EA8E85257BBA0059CD97/$FILE/NSS-ES-17.pdf).
- [51] YARA, “Cloruro de Potasio.” [Online]. Available: [http://www.yara.com.pe/images/MSDSGTec1008-Cloruro de Potasio \(Ver 03\)_tcm581-206610.pdf](http://www.yara.com.pe/images/MSDSGTec1008-Cloruro de Potasio (Ver 03)_tcm581-206610.pdf).