

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA

DE MÉXICO

U. N. A. M.

**FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTITLÁN



**DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES**

OBTENCIÓN Y USO DEL COLÁGENO EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA.

T E S I S :

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
INGENIERA EN ALIMENTOS**

PRESENTA:

MARGARITA JÉSSICA FLORES VELÁZQUEZ

ASESOR: DR. JUAN MANUEL ACEVES HERNÁNDEZ.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Obtención y uso del colágeno en la industria alimentaria

que presenta la pasante: Margarita Jéssica Flores Velázquez

con número de cuenta: 40008775-1 para obtener el título de:

Ingeniera en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 8 de Diciembre de 2004.

PRESIDENTE	Dr. Juan Manuel Aceves Hernández	
VOCAL	MC. Rosa Manuela Arriaga Orihuela	
SECRETARIO	LE. Jorge Bello Domínguez	
PRIMER SUPLENTE	Dra. Andrea Trejo Márquez	
SEGUNDO SUPLENTE	MC. María Guadalupe López Palacios	

A g r a d e c i m i e n t o s :

Gracias Dios por todo lo que me has dado, en especial por poner a tantas personas en mi camino que me enseñaron a valorar y aprender tantas cosas en la vida.

Gracias Mamá, Papá y hermanos por su apoyo, consejos, cariño y tiempo dedicado para ayudarme para que esta meta se haga realidad.

A todos mis familiares por su apoyo, cariño e interés.

A mis sinodales por su tiempo y consejos que durante la revisión de este trabajo que lo han enriquecido.

A todos los profesores y laboratoristas que laboran en esta Facultad por las facilidades prestadas para la realización de esta tesis.

A todos los que forman parte de la Generación 24 de Ingeniería en Alimentos por haber hecho de mi estancia en esta Facultad agradable e inolvidable, y por todo su apoyo aún después de haber terminado.

A mis amistades de diferentes generaciones y de otras carreras por enseñarme a quitar piedras para poder seguir en el camino y no tirar la bata con los primeros tropiezos.

LA VIDA ES LO QUE TE SUCEDE,
MIENTRAS ESTÁS PLANEANDO
HACER ALGO DIFERENTE.

JOHN LENNON.

NO TE PIDO MÁS DE LO QUE
PUEDES DAR, PERO SÍ TODO
LO QUE PUEDES DAR.

MAHATMA GANDHI.

ÍNDICE

1.- Introducción.....	4
2.- Antecedentes.....	6
2.1- Producción de Ganado Bovino.....	6
2.1.1.- Situación Mundial.....	6
2.1.2.- Situación Nacional.....	7
2.2.- Producción de Grenetina.....	10
.....	10
2.2- Generalidades de las proteínas.....	12
2.3.- El Colágeno.....	15
2.3.1.- Composición química y estructura.....	15
2.3.2.-Tipos de colágeno.....	17
2.4.- Métodos de Obtención de Grenetina.....	20
2.4.1.- Proceso Alcalino.....	23
2.4.2.- Proceso Ácido.....	24
2.4.3.- Vapor a presión.....	24
2.4.4.- Hidrólisis enzimática.....	26
.....	28
2.5- Propiedades físicas de la Grenetina.....	28
2.5.1.- Color y solubilidad.....	29
2.5.2.- Agregación molecular.....	29
2.5.3.- Rigidez del gel.....	30
2.5.4.- Punto de fusión.....	30
2.5.5.- Viscosidad.....	31
2.5.6.- Estudio de la estabilidad térmica de la red del colágeno.....	31
2.6.- Aplicaciones de colágeno y grenetina.....	32
2.6.1.- Industria Cosmética y Estética.....	32
2.6.2.- Industria Química.....	32
2.6.3.- Industria alimentaria.....	34
2.8.- Aplicación de películas comestibles a Frutos.....	36
2.8.1.- La Guayaba.....	38
3.- Metodología.....	42
3.1.- Objetivos.....	42
Objetivo General.....	42
Objetivos Particulares.....	42
Objetivo Particular 1.....	42
Objetivo Particular 2.....	42
Objetivo Particular 3.....	42
3.2.- Cuadro Metodológico.....	43
3.3.- Materiales y métodos.....	44
3.3.1.- Piel.....	44
3.3.2.- Enzima.....	44
3.3.4.-Grenetina y colágeno.....	45
3.3.5.- Eficiencia de degradación de la piel para la obtención del colágeno.....	45
3.3.6.- Obtención de colágeno.....	45
3.3.7.- Aplicación de Películas comestibles de Grenetina a frutos.....	46
3.4.- Técnicas analíticas.....	47
3.4.1.-Calorimetría.....	48
3.4.2.-Infrarrojo cercano (NIR).....	48
3.4.3.-Difracción de Rayos X.....	48
3.4.4.- Medición de los parámetros de calidad en las Guayabas.....	48
3.4.5.- Medición de parámetros fisiológicos.....	50
3.5.- Análisis estadísticos.....	50
4.-Resultados Y Análisis.....	50
4.1.-Eficiencia de degradación y Obtención de colágeno.....	50
4.2.- Caracterización térmica del colágeno.....	51
.....	53
4.3.- Identificación de grupos funcionales.....	55
4.4.-Identificación de la estructura de la molécula.....	59
4.5.- Aplicación de las Películas de Grenetina a Frutos.....	60
4.5.2.-Guayaba.....	60
5.-Conclusiones.....	71
6.- Recomendaciones sobre el trabajo.....	73
7.-Bibliografía.....	74
7.1.- Páginas Web Consultadas.....	79
8.- Anexos.....	81
8.1.- Anexo A Proceso de curtido.....	81
8.2.- Anexo B Calorimetría.....	85
8.3.- Anexo C Espectro Electromagnético.....	93
8.4.- Anexo D Espectroscopia Infrarroja.....	94
8.5.- Anexo E Difracción de Rayos x.....	98

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1 Producción Mundial de Ganado Bovino.....	6
Figura 2 Producción Nacional.....	7
Figura. 3 Producción de grenetina a nivel mundial.....	10
Figura. 4 Principales materias primas utilizadas para la fabricación de grenetina.....	11
Figura 5 Estructura de la hidroxiprolina.....	16
Figura 6 Orden del tropocolágeno.....	17
Figura 7 Diagrama de Proceso para la obtención de Grenetina.....	22
Figura 8 Proceso de Obtención de Grenetina.....	22
Figura 9 Diagrama de Proceso por el método de Vapor a Presión.....	25
Figura. 10 Diagrama de Proceso por el Método Enzimático.....	28
Figura 12 Termograma del colágeno A.....	53
Figura 13 Termograma del colágeno B.....	53
Figura 14 Termograma del colágeno D.....	54
Figura 15 Termograma del colágeno G.....	54
Figura 16 Termograma del colágeno M.....	55
Figura 17 Termograma del colágeno R.....	55
Figura 18 Infrarrojo cercano de los colágenos obtenidos.....	57
Figura 19 Difracción de Rayos X de los colágenos A, B D, G y M.....	60
Figura 20 Difracción de Rayos X del colágeno R.....	60
Figura 21 Pérdida de peso de la Guayaba.....	61
Figura 22 Diámetro de la Guayaba.....	61
Figura 23 Luminosidad de la Guayaba.....	63
Figura 24 Tono de la Guayaba.....	63
Figura 25 Cromaticidad de la Guayaba.....	64
Figura 26 Cambios externos de color en la guayaba durante la experimentación.....	66
Figura 27 Influencia de la película en la firmeza de la Guayaba.....	67
Figura 28 Sólidos Solubles de la Guayaba.....	68
Figura 29 Efecto del pH de la Guayaba.....	68
Figura 30 Acidez de la Guayaba.....	69
Figura 31 Tasa de Respiración de la Guayaba.....	70
Figura 32 Sistema del calorímetro.....	86
Figura 33 Enlace entre dos esferas.....	95
Figura 34 Transformada de Fourier.....	96
Figura 35 Difractómetro de polvo.....	100
Tabla 1 Consumo Nacional Aparente De Carne de Bovino 1999-2001.....	8
Tabla 2 Estimación de disponibilidad per capita de carne bovina 1999-2001.....	8
Tabla 3 Margen de Comercialización de carne de Res Octubre2004.....	8
Tabla 4 Reporte diario de Subproductos de Ganado en rastros del D.F. y área Metropolitana Precio/Kg (13 Febrero del 2005).....	9
Tabla 5 Ingreso del ganado en pie y cotizaciones por origen en los rastros de la zona conurbada del Distrito Federal.....	10
Tabla 6 Composición Química del colágeno bovino.....	15
Tabla 7 Principales usos de la grenetina en la Industria de Alimentos de acuerdo a sus propiedades de dureza.....	35
2.7.- Películas o empaques comestibles y biodegradables.....	35
Tabla 8 Materiales utilizados para la elaboración de Películas Comestibles.....	37
Tabla 9 Composición de la Guayaba.....	39
Tabla 10 Principales características de la proteasa de Bacillus Licheniformis (D-L-660).....	44
Tabla 11 Características del colágeno.....	45
Tabla 12 Aplicación de películas comestibles en limón.....	47
Tabla 13 Eficiencia de degradación Colágeno A 60°C 0.66% de enzima.....	51
Tabla 14 Eficiencia de degradación Colágeno B 60°C 1.32% de enzima.....	51
Tabla 15 Eficiencia de degradación Colágeno C 40° C 0.66% de enzima.....	51
Tabla 16 Eficiencia de degradación Colágeno E 40°C 1.32% de enzima.....	51
Tabla 17 Longitud de onda obtenida del NIR colágeno A, B, D, G, M y R.....	56
Tabla 18 Frecuencia características del infrarrojo de algunos compuestos heterocíclicos.....	57
Tabla 19 Frecuencia de algunos tipos de enlace.....	58
Tabla 20 Rango de espectros y tipos de enlaces que identifica.....	97

Resumen.

En el presente trabajo se llevó a cabo una investigación para la obtención de colágeno a partir del método de hidrólisis enzimática considerando el efecto de la temperatura, la concentración de enzima y el efecto del pH en la estructura de la molécula. Se identificaron los grupos funcionales con la ayuda de el infrarrojo cercano y se identifica la estructura por medio de las pruebas realizadas en Rayos X, así como también se identificó la temperatura de transición de los productos obtenidos experimentalmente y comerciales proporcionando por diferentes compañías.

Se realizaron pruebas de dispersión para elaborar la película comestible a base de grenetina (1%, 3% y 5%) con ayuda de agentes surfactantes y plastificantes relajantes, como el Tween y el glicerol realizándose la aplicación de la película al 5% en la guayaba, observándose una disminución del 50% la pérdida de peso durante los 19 días de almacenamiento. Además, retardó el proceso de maduración del fruto lo que se reflejo en el color (cromaticidad, luminosidad y tono), así como en la respiración. Mientras que de los otros parámetros de calidad medidos solo se encontró efecto significativo en la firmeza y en la acidez total titulable.

1.- Introducción.

En los subproductos animales se incluye todo aquello con valor económico que aparte de la canal, puede obtenerse de un animal durante su sacrificio y subdivisión. Estos productos se clasifican en comestibles y no comestibles, según se destinen o no a la alimentación del ser humano. Las industrias cárnicas se han caracterizado por su eficacia en el procesado y utilización de los subproductos aunque desde hace algunos años el valor de los subproductos ha descendido respecto de los animales vivos, debido a los avances tecnológicos que ha permitido la obtención de productos competitivos a partir de fuentes distintas de las animales (Forrest, 1986).

Dentro de los subproductos podemos encontrar a la piel que constituye el revestimiento de los animales superiores, que es un tejido heterogéneo, generalmente cubierto de pelos o lana y formado por varias capas superpuestas que responde a los cambios fisiológicos en el animal, que refleja características importantes y específicas tales como: edad, sexo, dieta, medio ambiente y estado de salud. Se puede definir utilizando tres criterios diferentes: estructural, embriológico o funcional; desde el punto de vista estructural, puede ser dividida en tres capas principales: la epidermis que está formada básicamente por la queratina, y en ella están los pelos que son eliminados en el proceso de depilación; la dermis que es la capa más importante, de la que resultará el cuero y, la hipodermis o tejido adiposo que es la camada inferior, y que es eliminada por la operación de descarnar. La constitución química de la piel recién retirada del animal, esta compuesta por agua en un 64%, 33% proteínas, 2% grasas, sales minerales y otras sustancias en 1% (Ockerman y Hansen 2000).

La curtiembre es la industria que transforma la piel animal (putrefactible), en cuero (imputrefactible); esta transformación, se denomina curtido, que varía de acuerdo con el estado de conservación al llegar a la curtiembre, raza, edad, sexo del animal, etc., y según la finalidad para la cual será utilizado el cuero (Forrest 1986; Ockerman 2000).

El colágeno es la proteína más abundante del reino animal constituye el 30% de toda la materia orgánica del cuerpo de un animal, o el 60% de las proteínas totales, por lo cual se pueden utilizar muchos tejidos como materia prima para la fabricación

de colágeno y/o grenetina. Los tejidos con las mayores cantidades de colágeno que se pueden encontrar entre los subproductos son usualmente las pieles y los huesos. El resto de las materias primas sólo se emplean en pequeñas cantidades; en contra de la opinión popular, los cuernos, los pelos, las plumas, piel de pollo y las cáscaras de los huevos no se pueden emplear para fabricar grenetina (Dominic y Wong 1995; Fennema, 2000; Rosa *et al.*, 2002; Streyser, 1995; Robinson, 1991).

La grenetina es uno de los productos con un uso extenso derivado del colágeno, debido a que las propiedades de la grenetina son útiles en la preparación de algunos materiales con características únicas y no pueden ser duplicados por cualquier otro hidrócoloide. La palabra gelatina deriva del latín *gelarse* que significa congelado, esto fue conocido desde hace más de mil años, el arte de cocinar cueros data desde los tiempos de los faraones egipcios. La gelatina se define por la U.S. Farmacopea como un producto obtenido por la hidrólisis parcial del colágeno de la piel de tejidos conectivos y huesos de animales (Rojas, 1979; Linden y Lorient, 1996).

La fabricación de grenetina se establece por primera vez a escala comercial en la década de los cincuenta. La materia prima empleada para la producción de grenetina es el colágeno, para cuya obtención se acude al sector del curtido de pieles y a las empresas elaboradoras de productos cárnicos. El proceso de conversión del colágeno en grenetina cubre varias etapas de lavado y depuración que culminan en la obtención de un producto alimentario deshidratado de color amarillo pálido (Poppe, 1997).

En el sector farmacéutico, se ocupa para la elaboración de cápsulas, como agente ligante y desintegrador, como complemento para personas que tienen deficiencia en la asimilación, entre otros. En la industria química se emplea en la fotografía, insecticidas, elaboración de piensos; en la industria cosmética está siendo utilizado como emulsificante, como fuente de proteína para la fabricación de cremas, shampoo, productos para tratamiento de cabello, uñas y piel. En el sector alimentario está creciendo el uso del colágeno por ejemplo como clarificante en bebidas preparadas, en embutidos donde su principal función es la retención de humedad y como complemento alimenticio, entre otros (Ochoa, 2000; Ockerman y Hansen 2000; Serra, 2000; Poppe 1997).

2.- Antecedentes.

2.1- Producción de Ganado Bovino.

2.1.1.- Situación Mundial.

La producción mundial en el 2004 se estima en 50.66 millones de toneladas con un consumo de 49.2 millones, los principales países productores de ganado bovino es Estados Unidos, Brasil, China y Argentina; México se encuentra en el octavo lugar como se observa en la Figura 1 mientras que el consumo sólo será del 1 %. La oferta tiende a incrementarse 2% en el 2005, mientras que el consumo sólo aumentará 1 %. La ausencia de Estados Unidos en los mercados asiáticos ha favorecido las exportaciones de otros países exportadores como Australia y Nueva Zelanda, mismos que han elevado su participación en Japón y Corea del Sur. Los países sudamericanos también seguirán ampliando sus mercados al tomar ventaja de las fluctuaciones del tipo de cambio y la menor producción en la Unión Europea resultado de los ajustes de la Política Agrícola Común (ASERCA; 2004).

Los subproductos vacunos que vende Uruguay genero en el año 2004 ingresos por casi 39 millones de dólares y se ubico en el 25% del volumen total de carne de exportación, destacando la venta de los siguientes productos la harina de carne, siendo el principal comprador Egipto, el sebo a granel con destino a Israel; los pulmones para los países europeos y el hígado para Alemania (<http://www.doloresnet.com/Agro/Hacienda/Subproductos.htm>)

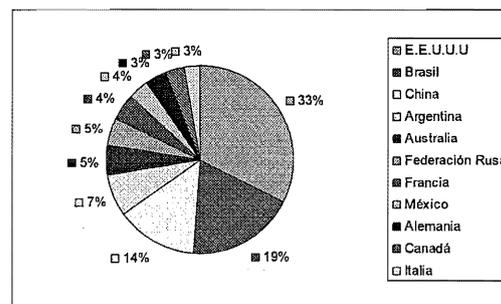


Figura 1 Producción Mundial de Ganado Bovino.

2.1.2.- Situación Nacional.

Las cifras de producción muestran que el crecimiento de la ganadería en México ha sido permanente en la última década, los principales estados productores son Veracruz, Jalisco y Chiapas como se observa en la Figura 2. En materia de carnes, la Tasa Media de Crecimiento Anual (TMCA) de 1990 a 2000 fue de 4.9 %. Para el caso del ganado bovino, se registra una expansión anual de 2.4 % el cual, si bien fue superior a la tasa de crecimiento demográfico, se vio frenado por su mayor precio relativo y una pérdida de imagen en la mente del consumidor, al relacionarse con enfermedades transmisibles al hombre como la encefalopatía esponjiforme bovina, mientras que la carne blanca, caprina, y la ovina van ganando preferencia por su bajo contenido de grasa y un precio accesible al poder de compra del consumidor. Como resultado de la promoción de la producción y productividad que serán promovidas por los Estados, se estima que la tendencia de producción para el año 2006 la Tasa media de crecimiento anual sea del 3 al 3.5 % en carnes, con lo cual se pretende cubrir la demanda domestica, sin descuidar las expectativas de exportación. El mercado local es de suma importancia para los productores rurales, por lo que la cría y el comercio del ganado y sus productos deben ser apoyados para lograr abastecer de alimentos nutritivos así como ingresos (ASERCA, 2000).

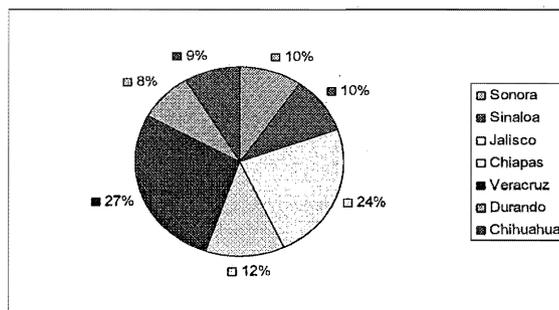


Figura 2 Producción Nacional.

Fuente: INEGI <http://www.ganaderia.com.mx/estadisticas/?s=estadistica&tema=estad06-04>

En la Tabla 1 se muestra el consumo nacional aparente (CNA) de la carne de res y se observa que el consumo incrementa año con año, El CNA es una forma de medir la cantidad de producto del que dispone un país para su consumo, se considera la producción nacional, las importaciones de ganado para abasto (convertidas a carne en canal) y las de carnes en canal y cortes, así como las exportaciones de ganado para abasto y/o engorda (convertidas a carne en canal) y carne en canal y cortes, para la estimación de la composición porcentual del CNA, a la producción nacional se le restan las exportaciones, además de mostrarse una gran disponibilidad per cápita en la Tabla 2.

Tabla 1 Consumo Nacional Aparente De Carne de Bovino 1999-2001.

Año	Composición Porcentual			
	Producción	Importaciones	Exportación	CNA
1999	1,399,629	287,769.5	104,505.3	1,582,893.2
2000	1,408,618	337,985.6	123,610.8	1,622,992.8
2001	1,428,393	339,138.5	124,536.3	1,642,995.2

Fuente: SAGARPA <http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/CNAbov.htm>

Tabla 2 Estimación de disponibilidad per capita de carne bovina 1999-2001.

Año	Bovino (kg/habitante/año)
1999	16.35
2000	16.3
2001*	16.5

Fuente: SAGARPA <http://www.sagarpa.gob.mx/Dgc/DPcar.htm>

Tabla 3 Margen de Comercialización de carne de Res Octubre2004.

Descripción	Origen	Precio promedio productor \$/ Kg	Precio promedio al mayoreo \$/ Kg	Precio promedio consumidor \$/ Kg	Participación del productor en el precio final en %
Carne en pie de bovino	Veracruz	20.75	33	62.47	33
Carne en pie de bovino	Guanajuato	21.5	33.5	62.47	34
Carne en pie de bovino	México	22	33.5	62.47	35
Carne en pie de bovino	Tabasco	14.74	32.75	62.47	24

Fuente: INEGI <http://www.ganaderia.com.mx/estadisticas/?s=estadistica&tema=estad24-04>

En la Tabla 3 se muestra, el comportamiento del precio pagado al productor en el mes de octubre con relación al de septiembre, se tuvo una tendencia a la alza en Guanajuato, Estado de México y Veracruz, equivalente al 3%, 5% y 7% respectivamente. Caso contrario se registró en Tabasco, al observarse una ligera disminución de 2%. Los precios al mayoreo de los estados analizados, presentaron una tendencia positiva que osciló entre 1% y 3% y los precios al menudeo se incrementaron en 1%. Con respecto de la participación del productor en el precio final, se observó que la de los productores de Guanajuato y Tabasco no presentó movimiento alguno, mientras que la de los de México y Veracruz observaron aumentos de uno y dos puntos porcentuales respectivamente. En octubre arribaron a los rastros de la zona conurbana del D. F. 22,634 cabezas, cifra menor en 7% a la registrada el mes pasado (24,445 cabezas). Las entidades que contribuyeron en mayor proporción con el abasto de ganado en pie fueron Veracruz, Querétaro, Jalisco, México y Aguascalientes, los cuales sumaron 85% de la oferta total. El Estado de Querétaro, Jalisco y Estado de México son los principales productores de carne bovina en el País.

Tabla 4 Reporte diario de Subproductos de Ganado en rastros del D.F. y área Metropolitana Precio/Kg (13 Febrero del 2005)

Rastro	Visceras Precio Promedio /Kg	Piel y sangre Precios Promedio/ Kg
Edo. Méx. : La Paz	1.40	9.00
Edo. Méx. : Ecatepec	1.40	10.80
Edo. Méx. : Temamatla	1.30	9.00
Edo. Méx. : Tlalnepantla	1.10	9.75
Edo. Méx. : Naucalpan	1.08	9.88
Edo. Méx. : Nezahualcóyotl	1.30	10.50

Fuente: INFOASERCA http://www.infoaserca.gob.mx/bovinos/gb_subproductos.asp

El precio promedio los subproductos de res en 13 de Febrero del 2005 es de 9.8 pesos por kg de piel o sangre lo que asegura un constante flujo de materia

prima para la elaboración de colágeno y/o grenetina en los rastros del Distrito Federal y el Área Metropolitana.

Tabla 5 Ingreso del ganado en pie y cotizaciones por origen en los rastros de la zona conurbada del Distrito Federal.

Estado	Participación (%)	Precios (\$/Kg) Novillo	
		Mínimo	Máximo
Aguascalientes.	9.78	21	22
Edo. De México	12.66	22	22
Guanajuato	3.78	21	22
Hidalgo	3.71	20.5	21
Jalisco	15.77	21	22.5
Puebla	3.7	21	21.5
Querétaro	29.17	20	22.5
Veracruz	17.55	20	21.5
Zacatecas	4.02	21	22.5
Total	100	20.9	22

Fuente: SNIIM http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ar_commarqcomer.html

2.2.- Producción de Grenetina.

Se presentan datos referentes a la producción anual de la grenetina en el 2003, a nivel internacional, como se puede observar en la Figura 3 y 4, que Europa Occidental es el principal productor y América del Norte es el segundo; siendo las principales materias primas ocupadas son las pieles de puerco, las pieles vacunas y los huesos.

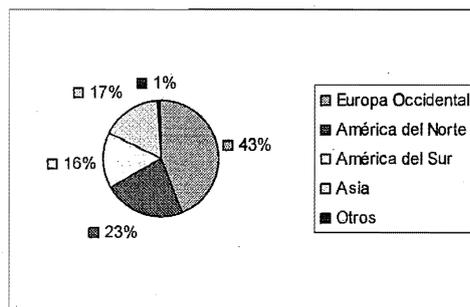


Figura. 3 Producción de grenetina a nivel mundial.

Fuente: <http://www.gelatine.org/es/gelatine/overview/127.htm>; <http://www.gelatine.org>; www.qmap-gelatin.com; www.sagma.org; www.gelatin-gmia.com

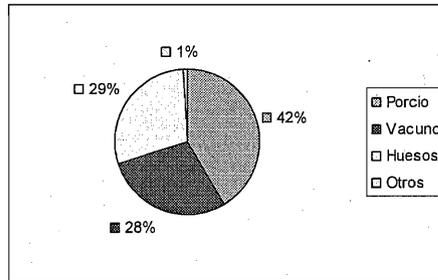


Figura. 4 Principales materias primas utilizadas para la fabricación de grenetina.

Fuente: <http://www.gelatine.org/es/gelatine/overview/127.htm>; <http://www.gelatine.org>; www.gmap-gelatin.com; www.sagma.org; www.gelatin-gmia.com

Los datos anteriores indican una situación favorable en la producción de ganado bovino en México pero existe una caída en su consumo básicamente por la tendencia del consumidor hacia alimentos saludables; los precios de los subproductos son bajos y con una alta oferta esto puede generar un incremento en la demanda con la diversificación de la producción para un consumo nacional y/o internacional.

El fomentar este tipo de actividades puede significar el mejoramiento del ingreso de los productores de ganado bovino, incrementarse la productividad y la generación de empleos al incrementarse la utilización los subproductos.

2.2- Generalidades de las proteínas.

Existen 20 α -aminoácidos que se componen de carbono, hidrógeno, nitrógeno, oxígeno y otros elementos tales como el azufre, hierro, fósforo, o cinc. Los aminoácidos son unidades estructurales básicas de las proteínas que constan de un grupo amínico, carboxílico y un grupo distintivo R (cadena lateral) que difiere en tamaño, forma, carga, capacidad de enlace de hidrógeno y de actividad química, que puede ser agrupado como: alifático, alifático hidroxílico, aromático, básico, ácido, amídico y azufrado. Muchos aminoácidos se unen mediante un enlace peptídico que es la unión del grupo carboxilo α de un aminoácido y el grupo amino α del aminoácido cercano y dan lugar a las proteínas (Devore, 1969)

Las proteínas son las moléculas orgánicas más abundantes en las células; constituyen más del 50 % de su peso seco. Cada proteína tiene funciones diferentes dentro de la célula y la mayor parte de la información genética es transmitida por las proteínas que alcanzan dimensiones de las micelas en el estado coloidal, la estructura de tamaño micelar con cargas eléctricas en su superficie les confiere propiedades de absorción. Pueden estar compuestas por una sola cadena polipeptídica; en tal caso reciben el nombre de monoméricas; o por varias cadenas polipeptídicas que pueden o no ser idénticas entre sí, y reciben el nombre de oligoméricas. Son macromoléculas por lo cual poseen pesos moleculares elevados capaces de reconocer e interactuar específicamente con otras moléculas debido a las cadenas laterales (Murray *et al.*, 1991).

Todas las proteínas que existen en la biología se identifican porque poseen una secuencia particular de aminoácidos determinada genéticamente que es única y propia de esa proteína (que permite identificarla por métodos bioquímicos, inmunológicos, etc.) y da lugar a su conformación que le confiere una función biológica específica; se conocen tres conformaciones repetitivas: α -hélice, hoja plegada β y la hélice del colágeno (Stryer, 1995; White *et al.*, 1978).

Se pueden clasificar, basándose en la composición y su conformación. De acuerdo con composición, las proteínas se clasifican en (Badui, 1991):

- ✓ Proteínas Simples: Son aquellas que por hidrólisis, producen solamente α -aminoácidos.

✓ Proteínas Conjugadas: Son aquellas que por hidrólisis, producen α -aminoácidos y además una serie de compuestos orgánicos e inorgánicos llamados: Grupo Prostético y de acuerdo a su grupo prostético se clasifican en:

- ✓ Nucleoproteínas (Ácido Nucleico)
- ✓ Metaloproteínas (Metal)
- ✓ Fosfoproteínas (Fosfato)
- ✓ Glucoproteínas (Glucosa).

En la estructura de las proteínas se distinguen las siguientes (Murray *et al*, 1991):

- ✓ Estructura primaria que es el esqueleto covalente de la cadena polipeptídica, que establece la secuencia de aminoácidos y la ubicación del enlace disulfuro.
- ✓ Estructura secundaria que es la relación espacial de los aminoácidos rige el arreglo espacial de la cadena polipeptídica en el espacio provoca los arreglos: α -Hélice, β -Hélice, γ -Hélice.
- ✓ La estructura terciaria es la forma en la cual la cadena polipeptídica se curva o se pliega para formar estructuras estrechamente plegadas y compactas como la de las proteínas globulares, donde rige el arreglo tridimensional en el cual participan las atracciones intermoleculares. (Fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno, puentes disulfuro, etc.).
- ✓ La estructura cuaternaria cuando poseen esta estructura es cuando están constituidas por dos o más cadenas polipeptídicas unidas por diferentes fuerzas enlaces covalentes, responsable de las funciones de las proteínas.
- ✓ En la estructura supramolecular las proteínas asociadas a otras moléculas se ensamblan formando estructuras más complejas denominadas supramoleculares y que ofrecen ventajas de una unidad funcional, teniendo en cuenta una complejidad intermedia entre la conformación cuaternaria de las proteínas oligoméricas por un lado y los lisosomas o las mitocondrias por otro. Es la orientación a la que se ven obligadas en el espacio para ejercer su carácter óptimo.

De acuerdo a su conformación, las proteínas se clasifican en (Stryser, 1995):

- ✓ Proteínas Fibrosas: Son aquellas que se hayan constituidas por cadenas polipeptídicas, ordenadas de modo paralelo a lo largo de un eje formando estructuras compactas (fibras o láminas). Son materiales físicamente resistentes e insolubles en agua y soluciones salinas diluidas. Ej. : colágeno, α -queratina, elastina.
- ✓ Proteínas Globulares: Están constituidas por cadenas polipeptídicas plegadas estrechamente, de modo que adoptan formas esféricas o globulares compactas. Son solubles en sistemas acuosos, su función dentro de la célula es móvil y dinámica (enzimas, anticuerpos, hormonas).

Una proteína nativa es aquella que presenta su conformación original cuando hay una desnaturalización que implica modificaciones en la estructura, que traen como resultado una alteración o desaparición de sus funciones y que puede producirse por una diversidad de factores, ya sean físicos cómo: el calor, las radiaciones ultravioleta, las altas presiones; o químicos cómo: ácidos, bases, sustancias con actividad detergente, etc. Este fenómeno genera la ruptura de los enlaces disulfuro y los puentes de hidrogeno, generando la exposición de estos. Cuando la proteína es desnaturalizada pierde sus características reológicas y físicas en una dispersión (viscosidad, velocidad de difusión y la facilidad con que cristalizan). La reversibilidad de la desnaturalización, depende de los agentes desnaturalizantes de la proteína y de lo cual depende del grado de ruptura generado en los enlaces (Robinson, 1991).

La hidrólisis de las proteínas termina por fragmentarlas en α -aminoácidos. Existen 3 tipos de hidrólisis (Murray *et al.*, 1991; Stryser, 1995; White, 19978):

- ✓ Hidrólisis ácida: Se basa en la ebullición prolongada de la proteína con soluciones ácida fuertes (HCl y H_2SO_4). Este método destruye completamente el triptófano y parte de la serina y la treonina.
- ✓ Hidrólisis básica: Respeta los aminoácidos que se destruyen por la hidrólisis anterior, pero con gran facilidad, forma racematos. Normalmente se utiliza (NaOH y BaOH).
- ✓ Hidrólisis enzimática: Se utilizan enzimas proteolíticas cuya actividad es lenta y a menudo incompleta, sin embargo no se produce racemización y no se destruyen los aminoácidos; por lo tanto es muy específica.

Dentro de las funciones específicas de las proteínas se encuentra que catalizan diferentes reacciones, el almacenamiento de aminoácidos, cómo elementos nutritivos; protección, forman parte de la estructura como funciones no específicas son amortiguadoras, energéticas y dentro de las funciones hereditarias (Devore, 1969; Murray *et al.*, 1991).

2.3.- El Colágeno.

2.3.1.- Composición química y estructura.

El colágeno es un material extracelular fabricado por los fibroblastos y es una proteína fibrosa que resulta relativamente insoluble en agua, en el existen unos 20 aminoácidos fundamentales, su composición química en general del colágeno bovino se ejemplifica en la Tabla-6 donde se observa que el colágeno es rico en prolina, alanina, hidroxiprolina e hidroxilisina.

Su secuencia permite identificar las cadenas de polipéptidos (son cadenas constituidas por aminoácidos) su unidad esencial está constituida por tres cadenas de polipéptidos que aparecen entrelazadas formando una triple hélice, constituyendo una unidad macromolecular denominada tropocolágeno (Dominic y Wong, 1995; Fennema, 2000; Mitchel y Ledward, 1986).

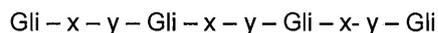
Tabla 6 Composición Química del colágeno bovino.

Aminoácidos	Porcentaje %
Alanina	9,3
Arginina	8,55
Acido aspártico	6,6
Acido glutámico	11,1
Cistina	trazas
Fenilalanina	2,2 (aminoácido esencial)
Glicina	26,9
Histidina	0,74
Hidroxilisina	0,91
Hidroxiprolina	14,0
Isoleucina	1,7 aminoácido esencial
Leucina	3,1 aminoácido esencial
Lisina	4,5 aminoácido esencial
Metionina	0,8 aminoácido esencial

Prolina	14,8
Serina	3,2
Treonina	2,2 aminoácido esencial
Tirosina	0,2
Valina	2,6 aminoácido esencial
Triptófano	— aminoácido esencial

Fuente: <http://www.farmaflora.com.br/literaturas/colageno.htm>, 2004

El peso molecular del tropocolágeno ha sido estimado entre 300.000 y 325.000 Dalton, esta molécula está constituida por tres cadenas de polipéptidos en cada una de las cuales hay alrededor de 1000 aminoácidos. La estructura de la triple hélice del tropocolágeno es fundamental y es característica de esta proteína fibrilar. Se encuentra la siguiente estructura repetitiva con la secuencia de aminoácidos que se simboliza de esta manera:



A lo largo de los 1000 aminoácidos que constituyen cada polipéptido, encontramos que de cada tres, uno de ellos es la glicina, el aminoácido más simple de todos y después encontramos dos aminoácidos donde "x" existe un aminoácido específico del colágeno que es la prolina y en el lugar de la "y" está la hidroxiprolina que es lo que caracteriza al colágeno. En la Figura 1 se presenta la estructura de la hidroxiprolina (Dominic y Wong, 1995).



Figura 5 Estructura de la hidroxiprolina.

Fuente: Dominic y Wong, (1995); Mc Murry, (2001).

La prolina y la hidroxiprolina constituyen juntas 22 % de todos los aminoácidos del colágeno donde la hidroxiprolina desempeña un papel fundamental y especial como elemento estabilizante de la triple hélice ya que cuando hay defectos de la hidroxiprolina se traduce en la desorganización de la triple hélice y por lo tanto de todo el colágeno. Finalmente, existen otros dos aminoácidos que se encuentran

solamente en el colágeno, que son lisina y la hidroxilisina. Las tres moléculas están perfectamente entrelazadas a lo largo de toda la molécula de tropocolágeno menos en las puntas, donde se pierde la triple hélice, de modo que la molécula de tropocolágeno es como un cilindro que tiene en las extremidades las tres moléculas polipeptídicas más desorganizadas, estas puntas son las que intervienen para formar uniones químicas con las moléculas de tropocolágeno adyacentes (Bailey y Light 1989).

El tropocolágeno como tal se forma en el fibroblasto y sale de él, pero la fibrilla de colágeno se forma sólo por la agregación ordenada de este tropocolágeno y esa agregación ordenada se da también de una manera muy regular y específica, cada molécula de tropocolágeno la podemos representar como en la Figura 2. Es una molécula que tiene 300 m μ de longitud y que además está polarizada con dos extremidades diferentes. En un primer sentido, las moléculas de tropocolágeno se ordenan a lo largo unas de otras, pero en la segunda hilera de moléculas, en el colágeno nativo, hay una hilera que vendrá de más atrás y así sucesivamente se colocan desfasadas (Fennema, 2000).

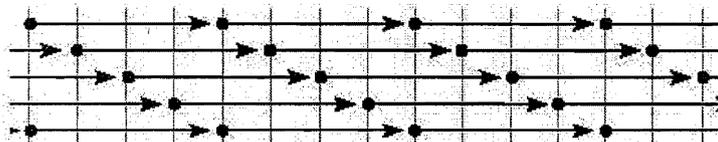


Figura 6 Orden del tropocolágeno.

Fuente: Fennema, (2000)

La cuarta molécula coincide con la primera. Esta disposición desfasada explica la aparición en el microscopio electrónico cuando se utilizan colorantes, una serie de bandas transversales que resultan del alineamiento en sentido transversal de distintas partes de la molécula de tropocolágeno que están dispuestas de esta manera. Esta disposición ordenada de las macromoléculas explica también una propiedad física y óptica fundamental que es la birrefringencia, que es uno de los métodos que se ha empleado para distinguir las distintas modalidades del colágeno (Bailey y Light, 1989).

2.3.2.-Tipos de colágeno.

Podemos encontrar diferentes tipos de colágenos naturales y comerciales entre los cuales destacan los siguientes.

2.3.2.1.-Natural

Dentro del colágeno natural los que más abundan en la naturaleza son el tipo I, II, III, IV y V y en menor proporción esta el tipo VI, VII, VIII, IX, X, XI que se localizan principalmente en el sistema vascular, la membrana amitótica y cartílagos (Bailey y Light, 1989; Robinson, 991; <http://www.cueronet.com/flujograma/curtido.htm>);).

✓ Colágeno Tipo I

Se caracteriza porque en este caso la molécula de tropocolágeno está constituido por dos cadenas que se denominan alfa 1(I), o sea, dos cadenas alfa 1 idénticas y una segunda cadena que se denomina alfa 2, que tiene una secuencia de aminoácidos distinta. Este es un colágeno fabricado fundamentalmente por los fibroblastos. Predomina en el hueso, en los cartílagos y en la dermis, o sea, que la mayor parte de colágeno de la dermis, que es lo que nos interesa a nosotros, pertenece a este Tipo I de colágeno. Son las fibras más gruesas de todas, fuertemente birrefringentes al microscopio de polarización y se tiñen selectivamente con un colorante específico del que se ha empleado en los últimos tiempos, que se denomina picrosirius. Este colorante permite distinguir el colágeno I del II, del III y también del IV y del V. En este caso las fibras aparecen de un color amarillo rojizo. Estas fibras tienen el bandeo transversal, sea la periodicidad transversal bien desarrollada, bien característica y constituye el colágeno más importante desde el punto de vista estructural.

✓ Colágeno Tipo II

Aparece en el cartílago y otras estructuras, como por ejemplo en el líquido que rellena el globo ocular llamado humor vítreo. Son fibras, por el contrario, muy finas, que no se ven o se ven con dificultad en el microscopio óptico, pero sí se ven con el microscopio electrónico. Son fibras que no presentan este bandeo característico que presenta las fibrillas del tipo I y están constituidas por tres cadenas denominadas alfa 1 (II). Son tres cadenas iguales, entrelazadas, donde lo característico es que hay más, hidroxilisina y lisina que en el colágeno ordinario de tipo I.

✓ Colágeno Tipo III

Corresponde a lo que clásicamente se denominaba a las fibrillas de reticulina, que aparecían impregnadas de color negro con las sales de Ag. Es un colágeno que aparece con mucha frecuencia vinculado al músculo liso y es fundamentalmente el colágeno de las vísceras, aunque también está presente en mayores cantidades en la dermis, sobre todo alrededor de los nervios y los vasos. Desde el punto de vista de la

composición de los polipéptidos tiene tres cadenas denominadas alfa 1 (III). O sea, tiene tres cadenas iguales, con una disposición de aminoácidos propia, donde predomina la hidroxiprolina y donde además aparece un aminoácido que no es muy común en otros colágenos, que es la cistina.

✓ Colágeno Tipos IV y V

Aparecen específicamente localizados en las membranas basales, o sea, en aquellas estructuras que separan generalmente los epitelios de los tejidos conjuntivos. El colágeno IV es muy frecuente en todas las membranas basales. El colágeno V se ha descrito específicamente en la membrana basal de la placenta (órgano muy especial, transitorio), que se cita solo para dar un ejemplo de cómo esta proteína se adapta a distintas funciones biológicas que van apareciendo a lo largo de la evolución de las especies.

2.3.2.2.- Comercial.

El colágeno puede presentarse de diferentes formas, sólido o líquido, representando las diferentes estructuras de la molécula en los tejidos conjuntivos y de las transformaciones que sufren desde la extracción y su preparación como materia prima, para su comercialización se distinguen: (Dumas *et al.*, 1989; Ochoa, 2000; Serra, 2000).

✓ Colágeno nativo:

No ha sufrido ninguna modificación de su estructura inicial; así tiene íntegramente sus cadenas polipeptídicas y sus telopéptidos, soluble o insoluble se distinguen.

- Nativo neutro-soluble: es aquel que puede ser solubilizado con una solución salina a pH neutro, corresponde al estado en que la estructura fibrilar es aún muy frágil y reversible, existe en poca proporción.
- Nativo ácido-soluble: es aquel que se extrae con el contacto de soluciones ácidas, precipitaciones salinas y diálisis, su principal fuente son las pieles de tejido joven.
- Nativo insoluble: con el transcurso del envejecimiento en vivo, el colágeno se retícula, se estabiliza, conduciendo a la insolubilidad progresiva de las fibras; su principal fuente de

extracción es la dermis por un tratamiento a base de ácidos orgánicos fuertes.

✓ Colágeno desreticulado.

La extracción se realiza por tratamiento enzimático, donde se rompen los telopeptidos de colágeno permitiendo liberar la zona de triple hélice. La integridad de la estructura triple helicoidal se mantiene y la solubilidad de la molécula aumenta. Se puede encontrar soluciones acuosas del 3% de colágeno desreticulado, mientras que sólo existe de 0.5% máximo para el colágeno nativo soluble.

✓ Colágeno desnaturalizado.

Existen métodos extractivos basados en el uso de agentes desnaturantes, que permiten obtener una estructura helicoidal más o menos destruida, por lo cual se habla entonces de gretina.

✓ Colágeno degradado.

La degradación corresponde a la ruptura de las cadenas α ; se caracteriza por poseer cadenas peptídicas de masa molecular menor a 100,000, estos colágenos también forman parte de las gretinas.

✓ Derivados del colágeno.

- Los hidrolizados de colágeno: son soluciones acuosas de un lisado de proteínas de la dermis de animales, su peso molecular promedio es de 1,500.
- Colágeno liofilizado: se obtiene por liofilización de un gel fibroso nativo, se presenta en forma de láminas.
- Colágeno Reticulado: se trata de un colágeno polimerizado después de sufrir un proceso de oxidación seguida de una neutralización. Se obtienen colágenos de solubilidad variable según su grado de reticulación y la posibilidad de unión a otras moléculas.

2.4.- Métodos de Obtención de Grenetina.

Desde el punto de vista químico, el colágeno y la grenetina están compuestos de largas cadenas de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos; los aminoácidos contienen grupos funcionales ácidos y básicos. En la composición de aminoácidos del colágeno y de sus derivados, grenetina y cola, prácticamente no hay triptófano y las concentraciones de metionina, cistina y tirosina son muy bajas. Por esta razón, no es una proteína completa desde el punto de vista nutritivo ya que no aporta las necesidades totales de aminoácidos esenciales (los aminoácidos que no puede sintetizar el organismo en cantidades suficientes y deben ser aportados por la dieta). Sin embargo, si la grenetina se incluye en una dieta normal en conjunción con otras proteínas, puede en algunos casos incluso aumentar el valor biológico de la proteína añadida. En estos casos de combinación proteica la grenetina es una buena fuente de proteínas (Michel y Ledward, 1986). Los hidrolizados de proteínas se utilizan ampliamente en alimentos por sus propiedades nutricionales o funcionales siendo su aplicación más importante su uso como fuente de nitrógeno en la formulación de dietas enterales para niños y adultos por lo que es deseable que sean osmóticamente equilibrados, hipoalergénicos, de alto valor nutritivo y un sabor agradable (Camacho *et al.*, 2000).

El objetivo en la elaboración de grenetina es controlar la hidrólisis del colágeno (de diversas procedencias) y convertir el producto resultante en un material soluble con las propiedades físicas y químicas deseables, entre las que están la resistencia de los geles, adherencia, color, consistencia y transparencia. Esencialmente, el proceso consiste en tres etapas fundamentales (Poppe, 1997):

- ✓ Separación del colágeno del resto de los componentes de la materia prima con la mínima alteración posible.
- ✓ Hidrólisis controlada del colágeno para su conversión en grenetina.
- ✓ Recolección y en el desecado del producto final.

Todos estos pasos y la materia prima inicial influyen en la calidad y rendimiento. Es necesaria una hidrólisis controlada para convertir el colágeno (cuyo peso molecular oscila entre 345.000 y 360.000 Dalton) en grenetina (con un margen de pesos

moleculares de 10.000 a 65.000, y solo en algunos casos llegando a 250.000). Sin embargo, una hidrólisis prolongada provoca disminución en los rendimientos y en las propiedades deseables. Asimismo, la naturaleza y condiciones de la materia prima influyen notablemente en el producto final.

Los tres procesos principales para obtener grenetina a partir del colágeno son los denominados alcalino, ácido y por vapor a presión, además de que se está investigando la obtención por hidrólisis enzimática. La figura 5 ejemplifica el proceso de obtención grenetina por hidrólisis del colágeno por tres procesos básicos.

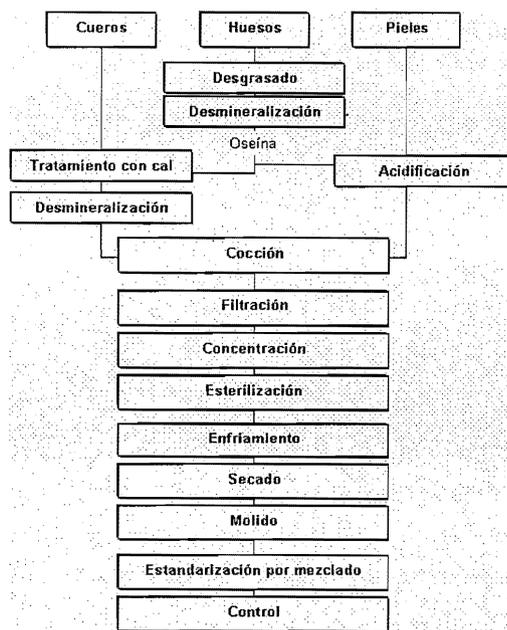


Figura 7 Diagrama de Proceso para la obtención de Grenetina.

Fuente: Poppe (1997)

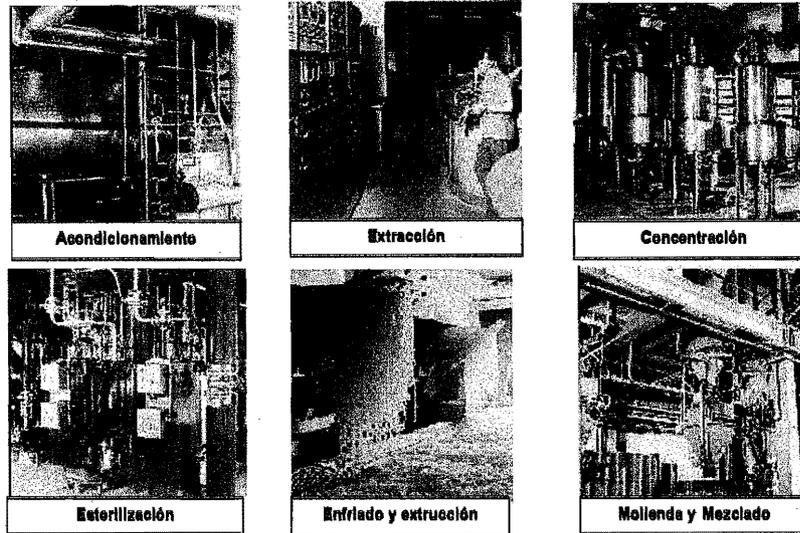


Figura 8 Proceso de Obtención de Grentina.

Fuente: <http://www.gelatina.org>; <http://www.gelita.com>; http://www.gmap-gelatin.com/how_made.html

2.4.1.- Proceso Alcalino.

La grenetina tipo B se refiere a la obtenida por el método alcalino y es el más empleado a nivel comercial, se puede ocupar, los nervios y la oselina de los huesos pero es más frecuente en los cueros, el proceso de lleva acabo de la siguiente manera como se ejemplifica en la Figura 7 (Ockerman y Hansen, 2000):

La materia prima se lava, se remoja con agua fría que luego se sustituye por una solución de hidróxido de calcio saturada que se renueva periódicamente, se utiliza aproximadamente el 10% del peso de la materia prima (provoca que las sustancias distintas del colágeno se modifiquen y faciliten su eliminación en el lavado siguiente), se elimina la cal con un lavado que dura de 1 a 2 días con agua fría seguida de una neutralización con ácido clorhídrico o sulfuroso hasta que el colágeno se deshinché y pierda consistencia. Se realiza otro lavado con sulfato aluminico o sulfato de zinc diluido y con un pH de 5 a 8.

Para la extracción del colágeno en forma de grenetina se procede una serie de extracciones que comienzan de 54 a 60 °C de 3 a 5 horas y se sigue hasta ebullición,

se llevan a cabo de 6 a 12 extracciones y cada una se procesa por separado ya que a una menor temperatura de extracción es de mejor calidad pero el rendimiento es bajo.

El extracto líquido se puede clarificar por alguno de los siguientes métodos:

- ✓ Filtración a presión en filtros de celulosa esterilizada al vapor.
- ✓ Centrifugación.
- ✓ Adición de sulfato de aluminio o proteína coagulable por calor como la albúmina de huevo donde el precipitado formado por floculos aglutina a las proteínas, lo que provocan turbidez y se eliminan por filtración o centrifugación.
- ✓ Se añade el 5% de carbón activado a una temperatura de 55-60°C de 4-6 horas después se filtra o centrifuga.

Después se puede llevar a cabo una desionización para que el contenido de ceniza sea menor al 0.5%, para ello se pasa la solución a través de una resina de intercambio catiónico fuerte, intercalada con una resina de intercambio aniónico fuerte, con un tamaño de partícula de 20 a 50 mesh. También se puede ocupar una ultracentrífuga con membrana de exclusión para moléculas de peso molecular inferior a 25000 Dalton.

Se procede a la etapa de concentración, donde el aumento de la temperatura en presencia de humedad produce una hidrólisis de los péptidos, lo que reduce la calidad de la grenetina y mientras que un periodo excesivo permite el desarrollo microbiano y reduce la resistencia del gel. La solución concentrada se coloca en una plancha en la que se enfría y se solidifican capas de 12 mm de espesor como máximo, se coloca en redes metálicas en unos marcos y se lleva a unos túneles de secado con aire lavado, filtrado y desecado a contracorriente, con un incremento de temperatura gradual de 8 a 12 horas hasta que tenga el 10 % de humedad.

La grenetina sólida se comercializa en láminas o se tritura en gránulos de 35-40 mallas o en polvo formando mezclas de las diferentes extracciones para conseguir la resistencia y viscosidad deseadas. Se pueden utilizar conservadores que dependen de la concentración de la grenetina y tienen la presencia de otros aditivos, este proceso puede tardar 6 semanas.

2.4.2.- Proceso Ácido.

En el proceso ácido o grenetina tipo A se aplica principalmente a las pieles de cerdo huesos y cartílagos. A diferencia del proceso alcalino como lo indica la Figura 7 se

utiliza un ácido inorgánico como el clorhídrico, sulfuroso, fosfórico o sulfúrico en alrededor del 5% en peso, hasta tener un pH de 3,5 a 4.5 y se deja reaccionar de 10 a 72 horas, lo que depende del tipo de materia prima siendo la temperatura óptima de 15°C y se neutraliza con hidróxido de sodio de 5 al 8% con pH de 6 a 6.5, que después se lava con agua fría y se extrae igual que en el procedimiento alcalino. El proceso puede tardar alrededor de 20 semanas.

(Ockerman y Hansen, 2000; Poppe J., 1997; Rojas, 1979)

2.4.3.- Vapor a presión.

Este método se usa principalmente para la obtención de cola y/o grenetina a partir de huesos y de piel de pescado. Aquí los huesos primero se desengrasan, ya sea que se expongan al vapor de disolventes en ebullición, como la bencina, o por medio de procesos más modernos, mediante impulsos mecánicos transmitidos a través de agua fría. El proceso de desengrase en frío perjudica menos al colágeno y hace posible la obtención de productos de mayor peso molecular, se procede a una limpieza mecánica (pulido) donde los huesos desengrasados se trasladan a autoclaves y se tratan alternativamente con vapor a presión y agua caliente, durante varios ciclos; el agua extrae de los huesos la molécula de colágeno y el vapor convierte el colágeno en cola obteniendo así cola como una sucesión de soluciones diluidas que pueden mezclarse o emplearse para extraer en contracorriente en series subsiguientes. Las primeras soluciones, que se han expuesto al mínimo calor, dan las colas de la más alta calidad. En la Figura 9 se describe de manera general el proceso de obtención por medio del método de vapor a presión.

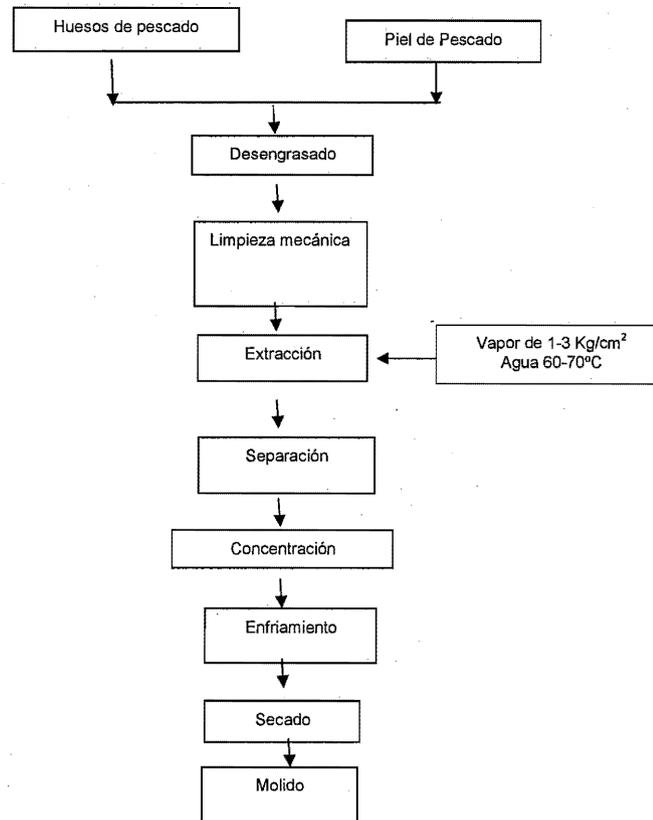


Figura 9 Diagrama de Proceso por el método de Vapor a Presión.
Fuente: Elaboración propia a partir de información de Ockerman y Hansen.

Se utiliza presión a vapor de 1 a 3 Kg/cm² y posterior extracción con agua caliente y cortos tiempos la hidrólisis se consigue por el choque térmico a elevadas temperaturas durante poco tiempo, seguido de un enfriamiento rápido en agua, el colágeno no se desnaturaliza por el efecto del calor ya que está rodeada de cristales de hidroxiapatita (redes minerales de fosfato tricálcico) varias veces. Para el caso de la grenetina se extrae entre 60 y 70 °C que para prevenir su degradación se repite a temperaturas mayores hasta que el rendimiento sea alrededor del 1 al 2% aunque aquí se obtienen geles de menor resistencia y viscosidad. Para la cola obtenida del pescado, las pieles se combinan con un volumen igual de agua y se inyecta vapor para su cocción, se puede añadir 1.9 L de ácido acético glacial por cada 100 litros de mezcla, la cocción inicial se hace durante 8 horas y el líquido se separa por compresión. El residuo se recombina con agua y se procede a una

segunda cocción a mayor temperatura, el residuo insoluble se usa para piensos; el otro residuo se concentra a vacío hasta que contenga 50-55% de sólidos (Ockerman y Hansen, 2000).

2.4.4.- Hidrólisis enzimática.

En los últimos años, la biotecnología ha experimentado grandes avances y, paralelamente a sus aplicaciones industriales en la obtención de diversos productos en las distintas áreas ya sea del sector alimenticio, farmacéutico, y químico. Los procesos catalizados por enzimas presentan ventajas considerables frente a la hidrólisis química por su alta selectividad del sustrato (incluso estereoselectividad y regioespecificidad), gran actividad catalítica, las condiciones moderadas de pH y temperatura, su gran actividad a temperatura ambiente y presión atmosférica, la ausencia de sustancias extrañas y mantiene el valor nutritivo (Camacho *et al.*, 2000). Es importante considerar que a pesar de estas ventajas, el empleo de enzimas no se ha generalizado en los procesos químicos industriales debido a que la mayoría no son estables en las condiciones de trabajo; además de ser solubles en agua, su separación de sustratos y productos es difícil, y por lo tanto, no se pueden reutilizar.

Con la inmovilización de enzimas se han podido resolver estos inconvenientes y permitiendo que los procesos sean económicamente rentables. Es necesario separar y/o desnaturalizar la enzima, trabajar en condiciones asépticas, controlar el proceso de la reacción y la caracterización de los hidrolizados en base de los péptidos que se necesite permitiendo así que la elección de la fuente proteica a utilizar en el proceso de hidrólisis se realiza en función del uso final que vaya a tener el hidrolizado y del valor añadido conseguido con respeto al sustrato de partida. Así para la obtención de hidrolizados con propiedades gelificantes y emulsificantes se suele emplear colágeno por su conocida capacidad para formar geles transparentes (Arroyo, 1998). El colágeno se degrada en condiciones fisiológicas, por enzimas específicas como colagenasas, proteasas neutras y captasinas lisosomales. Las colagenasas, principales enzimas de degradación, son metaloenzimas que requieren la presencia de calcio y zinc, producen una ruptura en un punto específico de cada cadena de colágeno como en un fragmento N-terminal (3/4 de la molécula o un fragmento C-terminal (1/4 de la molécula), así se pierde la conformación de la

triple hélice, liberando las cadenas nativas y facilitando el ataque por enzimas proteolíticas específicas. De acuerdo con Light y Bailes, el número de enlaces cruzados reducibles, disminuye con el paso del tiempo y se van reemplazando por enlaces estables, lo que proporciona cambios químicos y físicos porque se disminuye la solubilidad, la susceptibilidad a las enzimas, retención de agua y resistencia mecánica (Serra, 2000).

La mayoría de las enzimas proteolíticas tienen poca actividad frente al colágeno nativo, aunque degradan fácilmente el colágeno desnaturalizado; las enzimas que degradan el colágeno de los mamíferos son las colagenasas y proteinasas neutras, activas a pH fisiológico y capaz de catalizar la hidrólisis de las fibras de colágeno de la carne. Muchas proteinasas neutras pueden catalizar la hidrólisis únicamente de las regiones telopéptidas del colágeno, las colagenasas catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos específicos de la región de la triple hélice del colágeno que es resistente a las proteasas (Robinson, 1991; Fennema, 2000).

Las enzimas proteolíticas comerciales se pueden clasificar de acuerdo a:

- a) Su origen (pueden ser animal, vegetal, bacteriano o fúngico)
- b) Acción catalítica (pueden ser endopeptidasas o proteinasas si rompen al azar el interior de las cadenas peptídicas, y exopeptidasas si separan aminoácidos y dipéptidos de los extremos de las cadenas polipeptídicas)
- c) Naturaleza del sitio catalítico (así las endopeptidasas pueden ser serina-, cisteína-, metalo-, o aspartato-proteinasas y las exopeptidasas pueden ser amino-, carboxi- dipeptidasas).

Las primeras enzimas proteolíticas utilizadas fueron proteasas pancreáticas de origen animal, aunque las de origen bacteriano y fúngico están adquiriendo mayor importancia (White *et al.*, 1978).

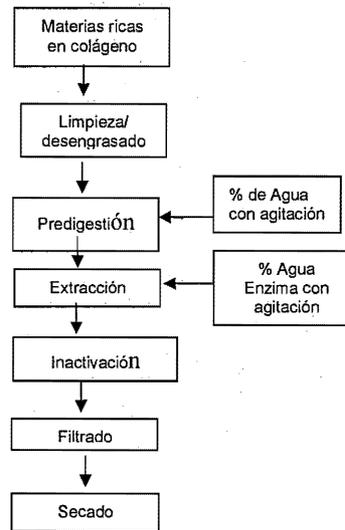


Figura. 10 Diagrama de Proceso por el Método Enzimático

Fuente: Elaboración propia a partir de información de Ockerman y Hansen (2000), Morimura *et al.* (2002).

Como lo muestra la Figura 10 en este método enzimático, se pueden utilizar las materias primas ricas en colágeno, se remueven las impurezas de grasa y de los compuestos inorgánicos, se colocan en un recipiente de predigestión se añade un porcentaje de agua, se calienta agitando para evitar que se pegue y evitar que se queме la materia prima, se agregan las enzimas de acuerdo a sus especificaciones y a las pruebas realizadas a nivel laboratorio, después de su completa disolución se filtra con una malla, se puede adicionar su respectivo inactivador y el conservador correspondiente, por último se lleva a cabo una clarificación y un secado (Morimura *et al.*, 2002; Manual MT, 2000).

2.5- Propiedades físicas de la Gernetina.

2.5.1.- Color y solubilidad.

La gernetina es un producto prácticamente insípido, inodoro e incoloro aunque tiende a un color pardo anaranjado la de menor calidad y además depende de la materia prima y de la extracción de la cual proviene; su densidad relativa oscila de 1.3 a 1.4 Kg/l. Es insoluble en agua fría solo se hidrata se dispersa cuando el agua se calienta a 71.11°C y es soluble en polialcoholes y propilenglicol e insoluble en solventes orgánicos como benceno, acetona, éter y tetracloruro de carbono. Esta sustancia depende el pH de la dispersión acuosa ya que actúa como ácido o como base (Rojas, 1979; Ockerman y Hansen, 2000).

2.5.2.- Agregación molecular.

La solidificación de las soluciones de gernetina para formar un gel cuando la temperatura disminuye, esta precedida por la formación de grandes agregados moleculares y un aumento en la viscosidad de la solución, conforme avanza la solidificación, los agregados comienzan a unirse entre sí y la solución se hace viscoelástica. Finalmente, solidifica en un gel que tiene muy poca tendencia a fluir bajo carga. La agregación de moléculas de gernetina se puede estudiar fácilmente en soluciones frías que estén demasiado diluidas para gelificarse. Se ha demostrado que a una temperatura dada, el tamaño de los agregados depende de la concentración de la solución de gernetina de la cual proceden; pero una vez formados son relativamente estables y permanecen como antes, individuales si la solución se diluye. Esto indica la existencia de cierta forma de unión múltiple tal como enlaces de hidrógeno múltiples y esta de acuerdo también con la histéresis normalmente observada en la solidificación y fusión de la gernetina, por lo cual el punto de fusión es mayor que el punto de solidificación. El punto de solidificación de las soluciones de gernetina se determina dejando soluciones durante un largo periodo y determinando la temperatura máxima a la que se forman los geles. Otra medida que se hace con frecuencia es el tiempo de solidificación de las soluciones a temperatura inferior al punto de solidificación. El método más satisfactorio es determinar el tiempo de solidificación de una gota que se

ha enfriado rápidamente, hasta la temperatura a la que ha de medirse el tiempo de solidificación (Mitchel y Ledward, 1986).

2.5.3.- Rigidez del gel.

La resistencia de los geles es una medida de la dureza, consistencia, firmeza y compresibilidad del gel a una determinada temperatura que depende de la concentración, del peso molecular, tiempo de maduración, pH y temperatura. Los cambios en la concentración afectan de forma similar, la rigidez depende aproximadamente del cuadrado de la concentración de la gretina, el punto de fusión puede definirse como la temperatura a la cual la rigidez se hace cero conocido como módulo de rigidez.

En el ensayo de la British Standard se prepara una gretina a una concentración de cola del 12.5% y de 6.67 % para gretina en un recipiente de vidrio y se madura durante 18 h a 10 °C. La resistencia de la gretina se determina con el gelometro de Bloom que consiste en una pieza con un diámetro de 12.7 mm, que se presiona lentamente dentro de la superficie del gel cargándola con perdigones y la caída de los perdigones se corta eléctricamente cuando la pieza ha recorrido 4mm. El peso de los perdigones en gramos da la resistencia Bloom de la gretina; la resistencia Bloom de la gretina es un ensayo empírico, pero los resultados están relacionados de una forma sencilla con el módulo de rigidez absoluto del gel por la ecuación: resistencia de la gretina (g Bloom) = $20 + 2.86 \times 10^{-3} \times \text{rigidez (din/cm}^2)$ para las gretinas comerciales oscilan entre 50 y 300 Bloom (Mitchel y Ledward, 1986; Ockerman y Hansen, 2000; Rojas, 1979).

2.5.4.- Punto de fusión.

Las propiedades de la gretina durante las transformaciones sol/gel y gel/sol son difíciles de investigar debido a que con el tiempo cambian, la principal medida es la temperatura de fusión de los geles y la temperatura o tiempo de solidificación de las soluciones aunque estos cambios dependen básicamente del método de medición de la velocidad de variación de la temperatura durante la medición.

Cuando un gel se calienta muy lentamente cerca del punto de fusión, provoca cambios en la estructura del gel que afecta la fusión, el punto de fusión de los geles es máximo cuando han sido madurados durante largos periodos a una temperatura próxima al punto de fusión. Después de este periodo de maduración, enfriando el gel hasta una temperatura baja, lo cual aumenta en gran manera la rigidez, no varía el punto de fusión. La estructura formada a la alta temperatura de maduración controla el punto de fusión y persiste durante el periodo en el cual se forma y se rompen nuevos enlaces si el gel se enfría y se calienta de nuevo.

El punto de fusión depende del enlace más fuerte en el gel, mientras que la rigidez a una temperatura dada depende del número total de enlaces que existen a esa temperatura. Los fuertes enlaces formados cuando las geles se maduran a temperaturas próximas al punto de fusión, en las que el retículo del gel esta abierto y las moléculas individuales tienen mayor movilidad, son probablemente resultado de un sistema de enlaces de hidrógeno altamente conjugados que pueden formarse más fácilmente en estas condiciones.

2.5.5.- Viscosidad.

La viscosidad se valora utilizando una concentración modelo al 6.67 % en un viscosímetro de tubo U determinando su salida a través de un orificio estándar de una copa empleando un dinamómetro de torsión por encima de 35-40⁰C, en que la temperatura es bastante alta para impedir la agregación molecular debida a las fuerzas de gelificación, la viscosidad de las soluciones de las distintas grenetinas depende de la concentración y la temperatura. A cualquier concentración normalizada la viscosidad de la solución de una indicación medianamente exacta del peso molecular, al menos para grenetina de punto isoeléctrico similar.

Se ve afectada también por el pH y por la presencia de sales, estos efectos que son muy marcados en soluciones diluidas. A temperaturas por debajo de 35-40 °C, las moléculas comienzan a agregarse bajo la acción de las fuerzas de gelificación y la viscosidad de las soluciones aumenta con el tiempo y puede ser no newtoniana. . (Rojas, 1979; Ockerman y Hansen, 2000).

2.5.6.- Estudio de la estabilidad térmica de la red del colágeno.

La desnaturalización del colágeno, es decir su paso de estructura ordenada helicoidal a estructura amorfa tipo grenetina se puede medir por un calorímetro diferencial programado. En efecto, esta transición provoca una reacción endotérmica que se traduce en un pico de absorción de calor, pues la superficie es proporcional a la entalpía de desnaturalización del colágeno.

2.6.- Aplicaciones de colágeno y grenetina.

2.6.1.- Industria Cosmética y Estética.

En el terreno de lo cosmético y de la estética, puede considerarse una pequeña revolución el uso del colágeno; debido a que los principales componentes tisulares que afectan al grado de envejecimiento en el material extracelular es el componente principal que determina las propiedades físicas (turgencia, elasticidad, firmeza) del tejido. Está tornado por una matriz orgánica en la que están relacionados diferentes tipos de fibras proteicas; estos componentes fibrosos son de tres clases principales: Colágeno, Elastina y Reticulina. Con el paso del tiempo, la síntesis de nuevas moléculas de tropocolágeno en los seres humanos disminuye, y las fibras de colágeno van sufriendo diversas alteraciones en su estructura y provoca una gran pérdida de elasticidad por parte de la fibra colágeno, lo cual se hace externamente visible al disminuir la tensión cutánea queda la piel flácida, y aparecen las arrugas. Por otro lado, las fibras pierden parte de su capacidad de retención de agua, y ésta pasa de estar embebida regularmente en la fibra, proporcionándole elasticidad y turgencia, a estar dispersa por la matriz intercelular amorfa, aumentando la presión extracelular, y favoreciendo aún más la flacidez cutánea (Ochoa, 2000).

En la industria farmacéutica la grenetina sirve para fabricar cápsulas, comprimidos y grageas y protege los medicamentos de la influencia dañina del aire y de la luz; como agente humectante en la elaboración de tabletas, de forma que resultan agradables y suaves en la boca, también sirve como agente ligante y desintegrador ya que la grenetina absorbe la humedad provocando que las tabletas se hinchen y se desmoronen. La grenetina glicerizada se emplea en la fabricación de pastillas y

gominolas utilizadas en las afecciones de la garganta y boca. También se utiliza como relleno o portadora de varias drogas, por su capacidad ligante y protección contra la oxidación atmosférica. Es un excelente estabilizador de emulsiones con la facilidad de que con una simple agitación se le puede devolver su condición original; también retarda la adsorción de diversos medicamentos.

2.6.2.- Industria Química.

En la industria fotográfica, los materiales fotográficos de sal de plata se componen de hasta 15 capas gelatinosas que están extendidas sobre la película o el papel. La grenetina sirve de aglutinante para los halogenuros de plata sensibles a la luz. Gracias a su capacidad de hincharse, las esencias fotográficas pueden entrar en las capas y pueden retirarse lavándolas. La grenetina es un componente importante para el procedimiento complicado de la técnica estratográfica. Tiene la propiedad de formar una solución que al calentarla se torna líquida y vuelve a ponerse rígida al enfriarse y se hace sólida una vez que se haya extraído el agua. Las propiedades de la grenetina se necesitan para la producción de películas fotográficas de alta sensibilidad, especialmente para lograr las altas sensibilidades necesarias para las películas de color y de rayos X. Asimismo en la fotografía digital el papel de impresión Ink Jet recubierto de grenetina garantiza colores brillantes y formas claras, dando como resultado fotos de suprema calidad.

Los hidrolizados y tenso-activos de colágeno, que se basan en la grenetina, son las sustancias activas con buena compatibilidad dermatológica en los detergentes y productos de limpieza y son biodegradables. Como aditivo en los detergentes estas sustancias desarrollan su efecto protector y envuelven la piel contra el ataque de los agresivos tensoactivos. Su propiedad característica de actuar como proteína protectora de las fibras aporta un efecto notable al tacto en los detergentes especiales para lana, seda y otros textiles delicados.

Las grenetinas seleccionadas y los hidrolizados de grenetina se emplean en gran volumen como fertilizante en hojas. La lenta descomposición de los aminoácidos produce una exacta dosificación del contenido en nitrógeno. Con ello, la grenetina ejerce una influencia positiva al metabolismo de las plantas.

En la producción de cerillos, las propiedades aglutinantes de la grenetina son imprescindibles para las cabezas de los cerillos.

La grenetina se utiliza también en la industria papelera: mejora la resistencia a la humedad y la resistencia del papel. Con ayuda de la grenetina pueden restaurarse incluso libros.

Si se añade la grenetina a los baños electrolíticos, se puede purificar los elementos zinc y cadmio ya que la grenetina facilita la separación de impurezas creando la base para producir metales de alta pureza.

En la restauración de edificios, por ejemplo el edificio de la ópera Sémper de Dresden, Alemania es uno de los teatros musicales más bellos de Europa, o del puente Alexander III, el puente más grande de París, se aprovecha la acción de la grenetina como cola elástica. La cola tiene su principal aplicación en la unión de la madera, fabricación de cintas adhesivas. La cola grado técnico se emplea para aplicar color al papel para empapelar paredes, para dar resistencia y rellenar sus poros mejorando así la posibilidad de imprimir los trazos en el papel tapiz.

Es posible que la grenetina pueda prestar en un futuro próximo una fabulosa ayuda en los accidentes de buques petroleros, en los cuales miles de litros de petróleo contaminan el agua forman finas gotitas de aceite que quedan suspendidas en el agua. Cuando se adiciona grenetina como aditivo, la fase acuosa fría pasa al estado de gel. El resultado es que obtenemos unos bloques conglomerados estables y resistentes al esfuerzo de corte, que se pueden almacenar durante un período prolongado. En el caso de una avería en un petrolero se podría evitar una catástrofe medioambiental consiguiendo que con la adición de grenetina el petróleo derramado formara unos bloques prácticamente "resistentes al corte". Hasta la fecha este procedimiento sólo se ha ensayado en sistemas cerrados. La formación de un gel sólido y reversible resulta mucho más difícil en el mar abierto. Así pues, la moderna investigación de grenetina trabaja también para resolver este complicado problema (www.sagma.org; www.gelatin-gmia.com; <http://www.gelatine.org>; www.gelita.com)

2.6.3.- Industria alimentaria.

En la industria alimenticia muchos de los productos semigrasos, bajos en grasa o de tipo "Light" no serían posibles sin la grenetina, ya que tiene un sabor neutro, absorbe grandes cantidades de agua, forma geles y brinda una "buena sensación bucal" a los alimentos. La grenetina es imprescindible para la producción de caramelos de goma, caramelos blandos, bombones, gofres, regaliz, merengues cubiertos de chocolate, y muchas golosinas más, donde proporciona elasticidad, la consistencia perfecta para masticar y un largo tiempo de conservación. En los dulces ligeros y espumosos la grenetina facilita la formación de la espuma y la estabiliza para un mejor transporte y almacenamiento de los productos debido a que con una dosificación correcta y el tipo de grenetina adecuado se elabora, yoghures cremosos y ligeros o productos más sólidos. En los productos de carne, pescados y embutidos la grenetina hace que los preparados de jalea tengan un aspecto apetitoso. Muchos tipos de salamis o embutidos con pimienta se protegen contra el secado mediante una capa de grenetina. En los productos de pescado, la grenetina suele utilizarse, en su mayoría, para preparados de jalea. La grenetina ofrece, además de funciones ópticas, protección contra la luz y el oxígeno. Los volovanes, platos pre-cocinados y otros platos exquisitos se enriquecen con la proteína de las grenetinas especiales que cobran cada vez mayor importancia. Por su elevado contenido de grasa y agua, los productos emulsionados presentan problemas de exudación de agua o grasa, o en un defecto de textura después de la cocción, al incorporar grenetina se da un efecto estabilizador de la emulsión, se aporta una mayor retención de agua y confiere textura homogénea y aquí se utilizan grenetinas de 150 a 250 Bloom. En el área de bebidas, la grenetina aumenta el placer de beber en la elaboración de vinos, zumos, la sidra y en algunos países las cervezas se someten a un tratamiento de grenetina para aclararlas ya que reacciona especialmente con sustancias taninas y amargas absorbiendo los elementos enturbiantes, provocando que se sedimenten y puedan separarse de la bebida; en los productos de pastelería, la grenetina estabiliza los rellenos y la consistencia es más sólida y se puede conservar durante más tiempo. Los principales usos en alimentos de acuerdo a la fuerza del gel se resume en la Tabla 7.

Tabla 7 Principales usos de la gnetina en la Industria de Alimentos de acuerdo a sus propiedades de dureza.

Sector Industrial	Fuerza del Gel (Bloom)	Viscosidad			Concentración Gnetina (%)
		Alta	Media	Baja	
Productos cárnicos Jamón, revestimiento	150-250	+	+		1-15
Productos lácteos Leche, crema, helados	150-200-250		+		0.2-1
Productos de confitería Gomas, caramelos	75-125	+	+	+	0.2-15

Fuente: Adaptado de Linden (1996); Poppe. (1997)

2.7.- Películas o empaques comestibles y biodegradables.

La tecnología del empaqueo ha extendido el uso de películas plásticas como una gran alternativa para prolongar la vida de las frutas y vegetales frescos sin olvidar considerar que el empaque debe garantizar la estabilidad del alimento, permitir su integración al medio ambiente, que sean funcionales y seguros para el consumidor. El impacto ambiental por el uso de envases y plásticos de origen sintético o no biodegradable es alto, por ello ha crecido el interés en desarrollar materiales biodegradables que ofrezcan costos competitivos a los materiales de empaque plásticos actuales y/o permitan racionalizar su uso.

Las películas o empaques comestibles y biodegradables se definen como una capa delgada de material formado sobre el alimento como una cubierta o colocado sobre él (preformado) o entre los componentes del alimento. Su función es inhibir la migración de humedad, oxígeno, bióxido de carbono, aromas y lípidos o como acarreador de ingredientes tales como antioxidantes, antimicrobianos, sabores y para mejorar la integridad o las características de manejo del alimento. A pesar de la información técnica disponible para su elaboración, las películas y recubrimientos son específicas para cada alimento; para el caso de la comercialización de frutos y hortalizas frescas proporcionan una cubierta protectora adicional cuyo impacto tecnológico es equivalente al de una atmósfera modificada representando así una alternativa a este tipo de almacenamiento; la elaboración de películas comestibles con subproductos desechables de la industria de alimentos ofrece la oportunidad de disminuir desperdicios, convirtiéndolos en materia prima de interés nutricional. Se

puede encontrar dos tipos: las películas poliméricas biodegradables que se elaboran con sustancias de origen natural, de composición heterogénea de tal manera que en un proceso de composta se transforman en compuestos de menor complejidad hasta llegar a la mineralización (bióxido de carbono, agua, y sales minerales); las películas poliméricas comestibles que son elaboradas con sustancias poliméricas naturales de composición heterogénea las cuales pueden ser ingeridas sin riesgo para el consumidor y que aportan algunos nutrientes. (Anónimo, 2004; Bosques, 2004; Del Valle *et al.*, 2004; López, 2003; Ratule, 2001; Yi Wu *et al.*, 2002).

En el presente trabajo se utiliza el colágeno con este último propósito

2.8.- Aplicación de películas comestibles a Frutos.

Los materiales que pueden ser usados para este fin se muestran en la Tabla 8 y son las proteínas, los polisacáridos, los lípidos, los poliésteres microbianos que se pueden usar solos o combinados y con diferentes aditivos de películas que dan diferentes propiedades de barrera que dependen fuertemente de su estructura química y de la interacción entre ellos y el alimento.

Las consideraciones más importantes en la elaboración de recubrimientos emulsificados son los estructurales, a fracción volumétrica de la fase dispersa, la distribución del tamaño de partícula y los aditivos en la formulación. Yi Wu y colaboradores (2002) mencionan que es importante considerar para futuras investigaciones de una película comestible los siguientes pasos:

- 1.- Realizar una investigación óptima de la composición y condiciones específicas para cada tipo de alimento,
- 2.- Estudiar las propiedades de barrera respecto al medio ambiente como humedad relativa y temperatura de almacenamiento.
- 3.- Investigación fundamental de los mecanismos de la transferencia de masa y la interacción entre los diferentes componentes de la película y del propio alimento.

Tabla 8 Materiales utilizados para la elaboración de Películas Comestibles.

Compuesto	Efecto	Ejemplo
Proteínas	Aumentan la firmeza	Colágeno, gretetina, zeína, gluten, aislado de proteína de soya, proteínas de leche.
Polisacáridos	Imparten cohesión	Almidón, alginato, carrageninas, pectina, quitosano, celofán, celulosa y derivados.
Lípidos	Adicionan un carácter repulsivo	ceras, acetoglicéridos, surfactantes
Poliésteres microbianos	Adicionan un carácter repulsivo	Ácido poliláctico, polulano, levano, elsinano.
Aditivos	Son usados para modificar las propiedades de barrera como son la permeabilidad al oxígeno, etileno y el vapor de agua; y las propiedades mecánicas como son la resistencia a esfuerzos mecánicos de tensión compresión.	Surfactantes iónicos rompen los enlaces de hidrógeno ya que (incrementan la carga de repulsión entre moléculas de proteínas Adyacentes.
		Materiales Hidrófobos los materiales hidrófobos (bajar permeabilidad.
		Plastificantes cambian las propiedades físicas y/o mecánicas, siendo el glicerol el más utilizado por su alta hidroflicidad y peso molecular.

Fuente: Anónimo (2004); Bosques (2004); López (2003)

2.8.1.- La Guayaba.

La guayaba es originaria de América, posiblemente de algún lugar de Centroamérica, el Caribe, Brasil o Colombia. Después del descubrimiento de América se propagó a otros continentes e incluso llegó a creerse que era originaria de Indochina y de Malasia (Asia Meridional) ya que en estos lugares se le conoce desde hace varios siglos y crece en forma silvestre. En México, la guayaba se produce de manera comercial en 16 estados de la República, y existe producción silvestre que no se contabiliza por lo menos en otros 11 estados del país. La superficie cultivada de la guayaba en México es de 16 mil 110 hectáreas, alrededor del 94% son de riego. La producción y explotación comercial de la guayaba están muy extendidas en numerosos países de América, Asia y África. Los principales países productores de guayaba en el mundo son: Pakistán, Egipto, México, Bangla Desh, Estados Unidos, Brasil, Colombia, Malasia, Tailandia, Perú, Sudáfrica, Venezuela, Indonesia y República Dominicana aunque la participación de la exportación de la fruta en el comercio exterior de los diferentes países que comercializan la guayaba en fresco es insignificante. De las variedades cultivadas en el mundo existe una amplia diversidad en México, donde encontramos a: la *Media China* en los principales estados

productores (Aguascalientes, Zacatecas y Michoacán); en otras regiones productoras se cuenta con variedades criollas identificadas con nombre regionales y locales como: *Regional de Calvillo, China, la Labor, Acaponeta, Coyame y otras* (ASERCA, 1996).

Aguascalientes ocupa el segundo lugar en volumen de producción a nivel nacional superado por Michoacán, pero en calidad del fruto sigue siendo el número uno, debido a las condiciones del clima, la topografía y el tipo de suelo de Calvillo, el cual le ha dado una calidad muy especial a la guayaba y sobre todo a la de invierno. Entre los meses de septiembre y enero se concentra alrededor del 70% de la producción nacional, el restante 30% se distribuye del mes de febrero a agosto, siendo los meses de mayo y junio los de menor disponibilidad del producto.

En México se estima que se procesan aproximadamente 25 mil toneladas de guayaba anualmente. Los procesos de industrialización que se le da son en: refrescos (que contienen aproximadamente 17% de pulpa de guayaba y absorbe el 70% de la industrialización); néctares (con 25% de pulpa de guayaba); guayabas enteras enlatadas; guayabas en mitades; refresco en polvo; alimentos picados y colados para bebé; jaleas, mermeladas y ates (ASERCA, 1996).

Las guayabas se cosechan en madurez fisiológica, en el estado verde-maduro (cambio de color del verde oscuro al claro) donde los consumidores prefieren las guayabas maduras, las frutas se cosechan en estado firme-maduro a madurez media de consumo (más blandas) para un transporte de larga distancia, o bien en plena madurez de consumo (amarillas y blandas) para los mercados locales su composición química se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9 Composición de la Guayaba.

Componente	%
Agua	83.5
Proteína	0.9
Grasa	0.5
Carbohidratos	5.8
Ácidos orgánicos	0.9
Minerales.	0.7

Fuente: Senser *et al.* (1999)

Los índices de calidad son color, (indica grado de madurez); tamaño y forma, (son importantes en algunos mercados); ausencia de defectos, insectos y pudrición; firmeza y grado de arenosidad debido a la presencia de células pétreas (esclereidas); el color de la pulpa que depende del cultivo y puede ser blanco, amarillo, rosa o rojo; la cantidad de semillas en la pulpa (entre más baja mejor); intensidad del aroma; sólidos solubles y acidez. La guayaba es una de las fuentes más ricas de vitamina C (200 a 400 mg por 100 g de peso fresco) y algunos cultivos son también ricos en vitamina A.

La temperatura óptima de almacenamiento es de 8-10°C (46-50 °F) para guayabas verde-maduras y parcialmente maduras (vida potencial de almacenamiento= 2-3 semanas) y de 5-8°C (41-46°F) para guayabas completamente maduras (vida potencial de almacenamiento de 1 semana); con una humedad relativa óptima de 90-95%. La tasa de respiración a 10° C es de 4 a 30 ml CO₂ / Kg·h y para calcular el calor producido se multiplica mL CO₂ /kg·h por 440 para obtener Btu/ton/día o por 122 para obtener kcal/ton métrica/día. La guayaba es una fruta climatérica y la tasa de respiración y producción de etileno dependen del cultivar y del estado de madurez fisiológica y de consumo. La producción de etileno a 20°C varía de 1 a 20 µL/kg·h. (ASERCA, 1996; Adel, 2004).

El etileno a 100 ppm por 1-2 días puede adelantar la maduración de las guayabas del estado verde maduro al completamente amarillo a 15-20°C y 90-95% de humedad relativa. Este tratamiento da lugar también a una maduración más uniforme, característica que es más importante en las frutas destinadas al procesamiento. Las guayabas verde-inmaduras (sin madurez fisiológica) no maduran apropiadamente y adquieren una textura o consistencia pastosa.

Adel (2004) reporta que los pocos estudios realizados con la guayaba con concentraciones del 2 al 5% de oxígeno a una temperatura de 10°C (50°F) pueden retrasar la maduración de las frutas en estado verde-maduro y con madurez parcial de consumo. No se han determinado las tolerancias a las altas concentraciones de bióxido de carbono. Los principales daños que puede sufrir la guayaba se describen a continuación.

- ✓ Daños por frío: Los síntomas incluyen incapacidad de las guayabas en estado verde-maduro o con parcial madurez de consumo para madurar normalmente, pardeamiento de la pulpa y, en casos severos, de la piel y un aumento en la

incidencia y en la severidad de las pudriciones cuando se les transfiere a temperaturas más altas. Las guayabas en plena madurez de consumo son menos sensibles al daño por frío que las que se encuentran en estado verde-maduro y se les puede conservar hasta por una semana a 5°C (41°F) sin mostrar síntomas de esta fisiopatía.

- ✓ Pardeamiento externo (piel) e interno (pulpa): las guayabas son sensibles al daño físico durante la cosecha y en todas las operaciones de manejo desde el campo hasta el consumidor. Los síntomas incluyen abrasiones y pardeamiento de las áreas magulladas.
- ✓ Escaldado por el sol: las guayabas expuestas al sol directo pueden escaldarse y en algunos países se les cubre con bolsas de papel para protegerlas de la radiación solar y del ataque de insectos mientras se desarrollan en el árbol.

La mayoría de los problemas con enfermedades postcosecha empiezan en la huerta como infecciones latentes en las frutas en desarrollo entre las cuales podemos encontrar (Adel, 2004)

- ✓ Antracnosis (causada por *Colletotrichum gloeosporioides* y especies asociadas),
- ✓ Pudrición por *aspergillus* (causada por *Aspergillus niger*),
- ✓ Pudrición por *mucor* (causada por *Mucor hiemalis*),
- ✓ Pudrición por fomopsis (causada por *Phomopsis destructum*) y
- ✓ Pudrición por *rizopus* (causada por *Rhizopus stolonifer*).

Las variedades producidas en el país se ven afectadas por algunas plagas y enfermedades. Por su extensión, la plaga más importante es la Peca, que afecta más o menos al 20% de la producción y que se manifiesta como pequeñas manchas que, sin alterar el sabor, textura o color del producto, hace que se le considere de inferior calidad.

Las estrategias para el control de enfermedades incluyen: buena sanidad de las huertas, manejo eficiente para reducir infecciones precosecha, manejo cuidadoso para reducir los daños físicos, inmediato enfriamiento a 10°C (50°F) y subsiguiente mantenimiento de esta temperatura a través de todo el sistema de manejo.

ATECEDENTES

La guayaba es uno de los hospederos preferidos por las moscas de la fruta y se le debe desinfestar para ser aceptada en muchos países. Uno de los tratamientos para el control de insectos es el calor aplicado por inmersión de las frutas en agua a 46°C por 35 minutos o por contacto de la fruta con aire caliente a 48°C por 60 minutos. Otro tratamiento potencial para el control de insectos es la irradiación a 0.15-0.30 kGy de radiación gamma.

(ASERCA, 1996; <http://www.infoaserca.gob.mx/proafex/GUAYABA.pdf> ;
<http://www.chapingo.mx/investigacion/pronisea/pro10.html>;
<http://rics.ucdavis.edu/postharvest2/Produce/ProduceFacts/Espanol/Guayaba.shtml>)

3.- Metodología.

3.1.- Objetivos.

El aprovechamiento de subproductos de las industrias de transformación de productos animales es destacable desde el punto de vista económico, donde es necesario su aprovechamiento para poder competir con otras fuentes proteicas de origen vegetal; así como proteger la salud pública, ya que su aprovechamiento repercute en la disminución de la contaminación. La obtención de colágeno a partir de pieles encaladas preparadas para el curtido, abre un nuevo campo en la industrialización de pieles en México para poder desarrollar esta industria y se generen más empleos así como pauta para ampliar el uso de la grenetina y el colágeno como películas comestibles en frutos.

Objetivo General.

Establecer un método de obtención cuantificación y caracterización del colágeno y la grenetina obtenida a partir de pieles y realizar su aplicación como película comestible a frutos.

Objetivos Particulares.

Objetivo Particular 1

Establecer un método de extracción de colágeno por medio de hidrólisis enzimática que permita una alta eficiencia en el proceso.

Objetivo Particular 2

Caracterizar de la molécula de colágeno los grupos funcionales, su estructura y su temperatura de transición que permitan conocer sus características y sus posibles aplicaciones.

Objetivo Particular 3

Evaluar el efecto de la aplicación de una película comestible de grenetina sobre los parámetros de calidad (textura, sólidos solubles, pH, acidez total titulable) y fisiológicos de guayaba.

3.2.- Cuadro Metodológico.

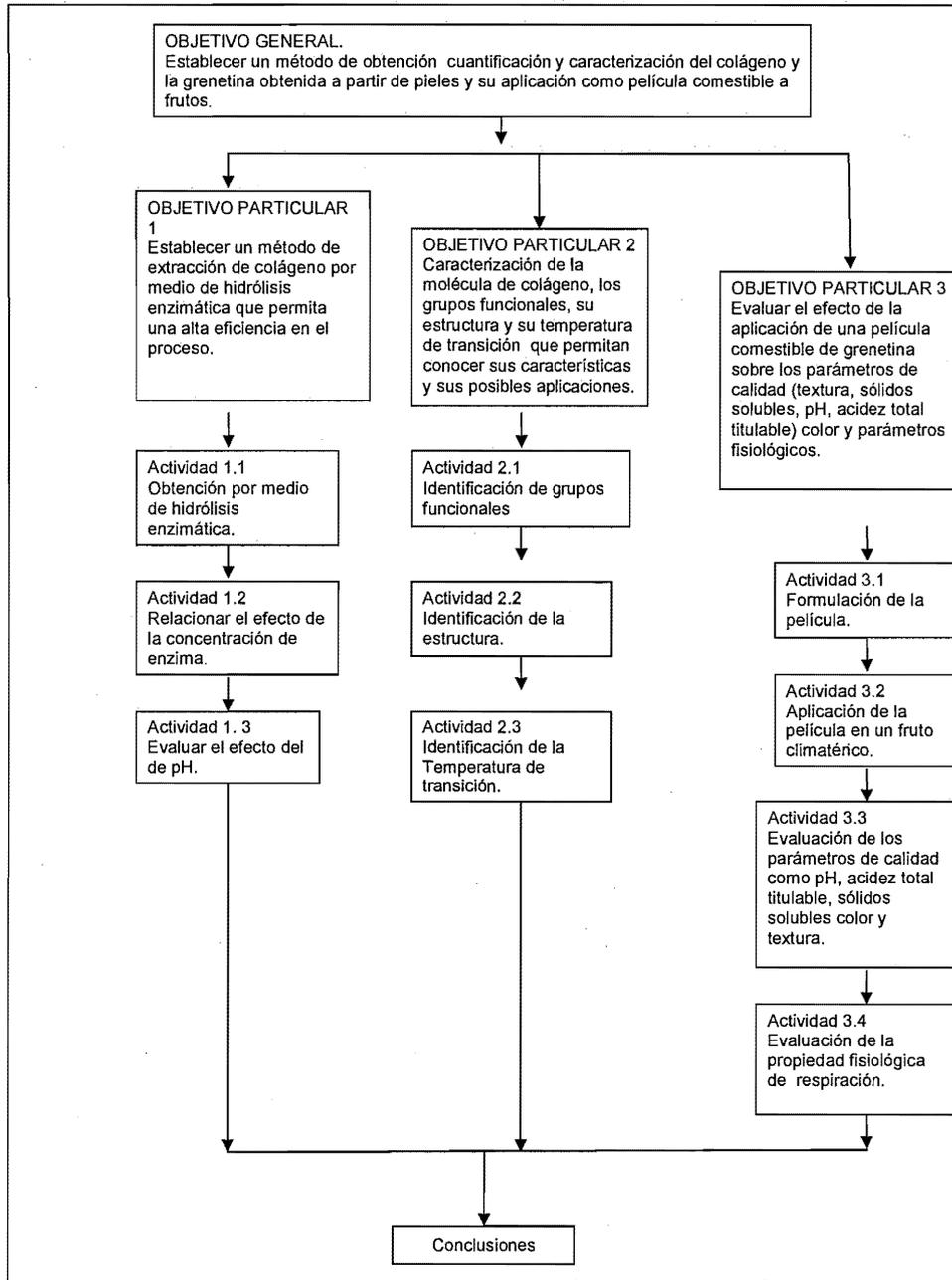


Figura 11 Cuadro Metodológico

3.3.- Materiales y métodos.

3.3.1.- Piel.

Se utilizó piel vacuna enclada de distintas partes del animal proporcionadas por una empresa curtidora ubicada en Guanajuato, fueron empaquetadas en bolsas de plástico al vacío de aproximadamente 2 Kg cada una. No se realizaron pruebas de caracterización debido a que se trabajo con ganado vacuno de diferentes edades, y se consideró la composición química promedio reportada en la bibliografía donde el 30 % de la piel es proteína, de la cual del 90 al 95% es colágeno (Rosa *et al.*, 2000; Ockerman y Hansen, 2000).

3.3.2.- Enzima.

La empresa ENMEX recomienda utilizar en evaluaciones iniciales de 60-120 g de enzima por cada kilogramo de proteína. La enzima utilizada fue Deterzyme-L-660 que es una proteasa, proporcionada por ENMEX, obtenida de *Bacillus Licheniformis* y viene en presentación líquida, sus principales características se muestra en la Tabla 10 .

Tabla 10 Principales características de la proteasa de *Bacillus Licheniformis* (D-L-660)

Parámetro	Características
Densidad	1.65 g/cm ³
pH	7-10 estable
Temperatura de mayor actividad	30-65° C
Inactivación	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 80 °C 5 min. pH 7 ✓ 50°C 30min pH 4 ✓ 60°C 60 min. pH 10
Inhibidores	Reactivos órganofosforados Agentes oxidantes que Liberen cloro activo

3.3.3 Guayabas.

Las guayabas se obtuvieron en estadio preclimatérico en la central de abastos de la Ciudad de México (CEDAC) provenientes de Aguascalientes.

3.3.4.-Grenetina y colágeno.

La grenetina obtenida a partir de la piel de vacuno ocupada para la elaboración de las películas es tipo B Wilson de 275 Bloom que fue proporcionada por el Grupo Gelita, la grenetina Danisco de 275 Bloom proporcionada por el grupo Danisco y colágeno M-T estos últimos para ayudar en la caracterización de la molécula.

3.3.5.- Eficiencia de degradación de la piel para la obtención del colágeno.

La piel se remojó 24 horas con agua en proporción 1:3 (piel: agua) después se llevó a cabo un lavado para retirar cualquier suciedad. Se trocearon 5 gramos de piel en cubos de aproximadamente 0.7x0.7 cm que se colocan en el vaso de precipitado con una relación de agua 1:2 y 1:4, se calentó a 60 °C con un pH de 7 y se adicionó la enzima con una relación piel: enzima (peso/peso) diluida con el 10% de agua inicial, se dejó reaccionar por 15, 30 y 60 minutos. Después de esto se inactivó a 80°C por 5 min. se filtró la piel se dejó secar 12 horas a temperatura ambiente y se pesó.

Todas las pruebas se realizaron por triplicado y los resultados presentados son el promedio +/- la desviación estándar. La eficiencia de degradación se calculó como la razón del peso degradado entre el peso inicial de la piel por cien de acuerdo con Morimura *et al.* (2002).

3.3.6.- Obtención de colágeno.

Se siguió el mismo procedimiento que en la eficiencia de degradación, solo que se dejó hasta que la piel sea consumida por completo por la enzima, se dejó evaporar con la temperatura de inactivación. Las características de cada proceso del colágeno obtenido y las sustancias de referencia se observan en la Tabla 11.

Tabla 11 Características del colágeno.

Tipos de Colágeno	Concentración de enzima	Temperatura del Proceso	pH proceso	Tipo de inactivación
Colágeno A	0.66 %	60 °C	7	80°C 5 min. pH= 7
Colágeno B	1.32 %	60 °C	7	80°C 5 min. pH= 7
Colágeno C	0.66%	40 °C	7	80°C 5 min. pH= 7
Colágeno E	1.32%	40 °C	7	80°C 5 min. pH= 7
Colágeno D	Grenetina Danisco			
Colágeno G	Grenetina Gelita			
Colágeno M	Colágeno M-T			
Colágeno R	1.32 %	60 °C	4.9	50 °C 60 min. Ácido acético

3.3.7.- Aplicación de Películas comestibles de Grenetina a frutos.

3.3.7.1.- Preparación de la Dispersión para la Película Comestible.

Se realizó una solución base con ácido acético al 2% (v/v) en agua que se calentó lentamente hasta la temperatura indicada (80 °C) en la aplicación de la película que funciona como agente antimicrobiano, a la cual se le adiciona la grenetina en el porcentaje requerido (p/p), se homogenizó durante 20 minutos y se le adicionó el glicerol al 0.3% (p/p) y el Tween 60 el 0.6% (p/p) dejando homogenizar por 10 minutos cada uno.

3.3.7.2.- Aplicación de la película comestible.

Las películas fueron aplicadas a limón sin semilla, limón mexicano y guayabas. Los tratamientos que fueron realizados para la conservación de los limones sin semilla frescos por medio de las películas a base de Grenetina se distinguen en la Tabla 11, en donde para todos los tratamientos se procedió de la siguiente manera:

1. Se seleccionaron lotes homogéneos de frutos de acuerdo a color, peso y diámetro.

2. Se aplicó el recubrimiento por inmersión, sumergiendo el fruto en la solución a la temperatura y tiempo indicado,
3. Se dejaron secar 24 horas con una ventilación media, midiéndose su diámetro y su peso.

Para el caso de los limones la experimentación previa se realizó por duplicado; los tratamientos que se llevaron acabo con los limones sin semilla se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12 Aplicación de películas comestibles en limón.

Tipo de Tratamiento	Características del Tratamiento.
A	Grenetina: 3% Temperatura de aplicación :25C Tiempo de aplicación: 30 minutos.
B	Grenetina: 3% Temperatura de aplicación :25C Tiempo de aplicación: 60 minutos.
C	Grenetina: 5% Temperatura de aplicación :25C Tiempo de aplicación: 30 minutos.
D	Grenetina: 5% Temperatura de aplicación :25 C Tiempo de aplicación: 40 minutos.
E	Grenetina: 5% Temperatura de aplicación :40C Tiempo de aplicación: 20 minutos.
F	Grenetina: 5% Temperatura de aplicación 40C Tiempo de aplicación: 10 minutos.

Se seleccionó la aplicación de película que presentó una menor pérdida de peso y las mejores condiciones físicas para realizar una experimentación en limón sin semilla y limón mexicano para poder medir los parámetros de calidad como textura, sólidos solubles, pH, acidez y color además de ver la influencia de la película en la respiración del fruto de acuerdo a los procedimientos descritos en el apartado de técnicas analíticas. Sin embargo, esta aplicación fue descartada ya que los resultados obtenidos no fueron adecuados, por lo que se aplicó a guayabas.

Para la aplicación en guayabas se procedió como en los limones y se utilizó una película elaborada al 5% de grenetina se dejaron en la solución 5 minutos a 25°

C y se secaron 24 horas y se midieron los parámetros de calidad como en el caso del limón.

3.4.- Técnicas analíticas.

3.4.1.-Calorimetría.

Las pruebas de flujo de calor de los diferentes colágenos obtenidos se realizó por calorimetría diferencial de barrido, donde se ocupo de 5 a 10 mg de muestra con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. de 20 a 200 °C, con 20 ml de N₂ / min. como purga y charola de aluminio con la ayuda de un calorímetro de barrido diferencial marca Universal V2.5HTA Instruments. Para una descripción mas detallada sobre los fundamentos ver el Anexo B.

3.4.2.-Infrarrojo cercano (NIR).

Para identificar los grupos funcionales que conforman la molécula se realizó un estudio de espectroscopia donde la muestra se coloca cubriendo el fondo de la celda y que sea la misma cantidad utilizada para cada corrida, la longitud de onda utilizada es de 1100 a 2500 nanómetros en un espectrofotómetro Marca NIRS System Modelo 6500.

Primero se identificaron los grupos funcionales que conforman a la molécula, después se revisa el rango del Infrarrojo ocupado para luego realizar una revisión bibliográfica de los rangos de absorbancia obtenidos y así poder identificar a los grupos funcionales. Su fundamento se explica en el Anexo D.

3.4.3.-Difracción de Rayos X.

Para realizar las pruebas reestructura de la molécula se realizó un estudio de difracción de Rayos X donde se utilizó un Difractómetro de Rayos – X marca Siemens modelo Kristalloflex 5000, usando el siguiente procedimiento: se pulverizaron las muestras en un mortero de ágata lo mas fino posible para

poder identificar si la muestra es cristalina o amorfa, como en el caso de un polímero, los fundamentos se describen en el Anexo E.

3.4.4.- Medición de los parámetros de calidad en las Guayabas.

3.4.4.1.- Pérdida de peso.

Para el porcentaje de pérdida de peso se calcula con la razón del peso perdido entre el peso inicial por cien.

3.4.4.2.- Firmeza.

La firmeza se evaluó en la zona media del fruto con un penetrómetro manual modelo FT 327 y que expresa la fuerza de penetración ejercida sobre la superficie del fruto en Kg. /cm².

3.4.4.3.- Sólidos solubles.

Se utilizó un refractómetro manual que cuantifica de manera directa el porcentaje del contenido de sólidos solubles y se expresan como grados Brix.

3.4.4.4.- Acidez total titulable y pH.

Para la medición de pH se homogeneizó la muestra en un mortero y se pesaron 10 de pulpa y se afora con 100 ml de agua, al filtrado se le mide directamente el pH con un potenciómetro manual mod. EN50081-1.

Para la acidez se tomó una alícuota de 20 ml que se titula con NaOH 0.1 N usando como indicador fenolftaleína y se expresa la acidez en base al ácido orgánico mayoritario que es el ácido cítrico, y los cálculos son de la siguiente manera:

$$\% \text{ Acidez (expresado Ácido cítrico)} = \frac{(g \cdot N \cdot meq \cdot V \cdot 100)}{m \cdot a}$$

Donde:

g = Gasto de NaOH.

N = Normalidad de NaOH.

Meq = Miliequivalentes del ácido cítrico.

m = Gramos de muestra.

a = Alicuota en ml.

3.4.4.5 Color.

El color de los frutos se determinó con un colorímetro Minolta modelo CR-300. El color de la piel se realizó en diez frutos; se utilizó el sistema Hunter Lab obteniéndose L, a y b; donde "a" en abcisas tiene valores negativos para el verde y positivos para en rojo; "b" en ordenadas va de azul a amarillo; mientras que "L" representa la luminosidad desde reflexión nula (L= 0) a difusión difusa (L=100). Para calcular tono (ángulo de Hue) es $h^{\circ} = \arctan (b/a)$ donde 0° = rojo-púrpura, 90° = amarillo, 180° = azul-verde 270° = azul. El croma indica la intensidad de color o saturación de color y se calculó mediante $C^* = (a^2 + b^2)^{1/2}$ (Del Valle *et al.*, 2004; Trejo, 2000).

3.4.5.- Medición de parámetros fisiológicos.

3.4.5.1.- Respiración.

Se valoró en función de CO₂ producido, para su cuantificación se colocaron los frutos en un sistema cerrado y se dejó 1 hora para medir el CO₂ producido por el fruto, se conectó a un analizador de gas marca NITEC y los resultados se expresan en mg de CO₂ Kg.⁻¹ h⁻¹.

3.5.- Análisis estadísticos.

Se realizaron tres replicas a excepción de los indicados y se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de 0.5% para establecer si existe diferencia significativa entre las medias.

4.-Resultados Y Análisis.

4.1.-Eficiencia de degradación y Obtención de colágeno.

La eficiencia de degradación se observa en la Tabla 13, 14, 15 y 16 con la misma concentración de enzima se mantiene constante con respecto al tiempo del proceso de una hora; mientras que se observó que la eficiencia con respecto a la temperatura es menor si la temperatura baja a 40°C. Por lo tanto la eficiencia de degradación esta en función de la temperatura y de la concentración de la enzima respecto a un mismo tiempo. Sin embargo cuando se trabajó para la obtención de colágeno con la temperatura de 40°C se observó que se requiere de mucho tiempo y esto provocó que el agua se evapore y haya que adicionar mas y esto repercute en un mayor gasto de energía y recursos respecto a las de 60°C debido a ello para las posteriores pruebas se consideraron solo el colágeno A y B.

Tabla 13 Eficiencia de degradación Colágeno A 60°C 0.66% de enzima.

Tiempo (min.)	% Eficiencia
15	49.0 +/- 0.146
30	49.4 +/- 0.112
60	49.2 +/- 114

Cada valor representa los valores promedio de tres replicas +/- desviación estándar.

Tabla 14 Eficiencia de degradación Colágeno B 60°C 1.32% de enzima.

Tiempo (min.)	% Eficiencia
15	99.0 +/- 0.155
30	99.4 +/- 0.133
60	99.8 +/- 0.132

Cada valor representa los valores promedio de tres replicas +/- desviación estándar.

Tabla 15 Eficiencia de degradación Colágeno C 40° C 0.66% de enzima.

Tiempo (min.)	% Eficiencia
15	40.7 +/- 3.401
30	40.6 +/- 3.124
60	40.8 +/- 3.541

Cada valor representa los valores promedio de tres replicas +/- desviación estándar

Tabla 16 Eficiencia de degradación Colágeno E 40°C 1.32% de enzima.

Tiempo (min.)	% Eficiencia
15	89.0 +/- 3.944
30	89.4 +/- 3.000
60	89.6 +/- 3.996

Cada valor representa los valores promedio de tres replicas +/- desviación estándar

4.2.- Caracterización térmica del colágeno.

Las proteínas generalmente se desnaturalizan cuando la temperatura de la solución proteica sube alrededor de 50 a 60 °C durante un periodo determinado, pero la temperatura exacta que induce a los cambios conformacionales varia ampliamente de proteína a proteína, la desnaturalización por calor frecuentemente es reversible, pero en muchos casos tiene lugar con la agregación de la proteína con precipitación (White *et al.*, 1978).

El calentamiento de las fibras de colágeno en agua de 60 a 70 °C se encoge de un tercio a una cuarta parte de su longitud original a una temperatura crítica denominada Temperatura de Encogimiento o Retracción que es característica de la especie de la cual se deriva, para el colágeno de los mamíferos es de 80° C; y para el de pescado es de 35 °C; el punto medio de la transición del colágeno a grenetina se define como temperatura de fusión. Durante la transición de colágeno a grenetina se rompen enlaces no covalentes junto con algunos enlaces covalentes inter e intramoleculares y unos pocos enlaces peptídicos dando lugar a la conversión del colágeno a una forma más amorfa: la grenetina. Sin embargo si se obtiene una molécula completamente desestructurada da origen a la cola (De Man, 1999; Fennema, 2000).

En las figuras 12, 13, 14, 15, 16 y 17 se observa que son reacciones exotérmicas las que muestran las temperaturas de transición de los diferentes colágenos estudiados destacando que para el colágeno A, M y R las temperaturas de transición mas notables son: 119.2 °C con 7.341 J/g de calor y de 126.51°C y 2.657 J/g en M y para R 132.17 °C con 1.186 J/C teniendo estos un comportamiento similar entre si, debido a que se tiene otro tipo configuración en su estructura por el tipo de inactivación, indicando que sus moléculas son de un mayor peso molecular que el siguiente grupo.

Para los tipos de colágeno B, D, y G tenemos que sus temperaturas y calor de transición son las siguientes: de 69.02 °C y 99.35 J/g ; 67.73 °C y 80.14 J/g ; 636.17 °C y 41.44 J/g, respectivamente; esto muestra que entre si tienen una configuración semejante y difieren de los anteriores ya que indica que tiene moléculas de un menor peso molecular.

Sin embargo, en todos los colágenos estudiados, la primera temperatura de transición oscila entre los 59- y 75 °C; indicando que por el tipo de materia prima (piel de res); y la concentración de enzima además del tipo de inactivación utilizada esta dentro del rango que indica la bibliografía y es cuando se transforma de colágeno a grenetina.

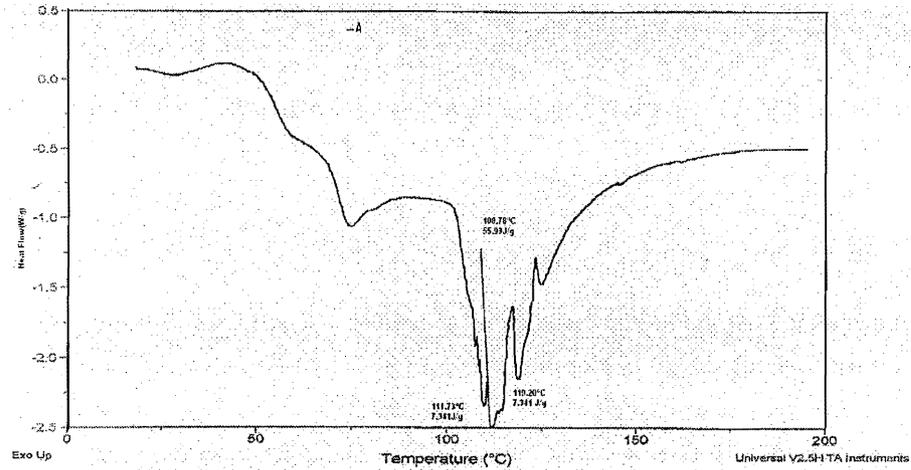


Figura 12 Termograma del colágeno A

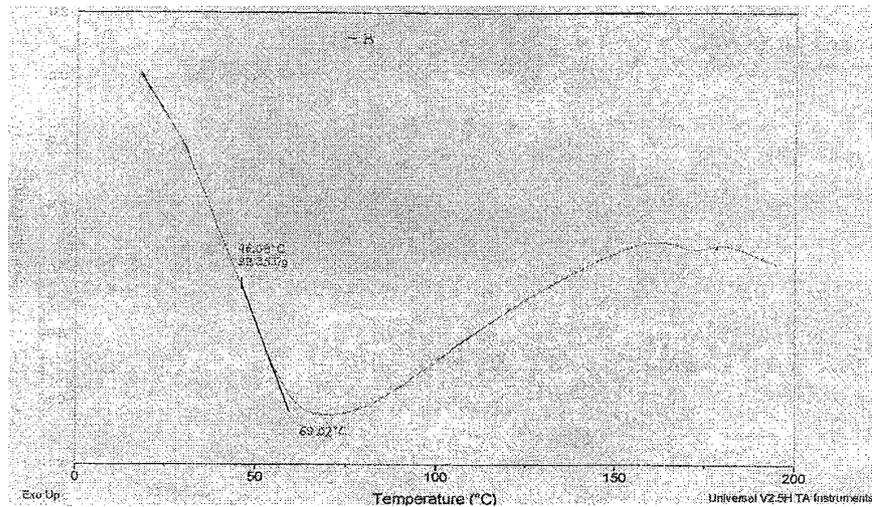


Figura 13 Termograma del colágeno B

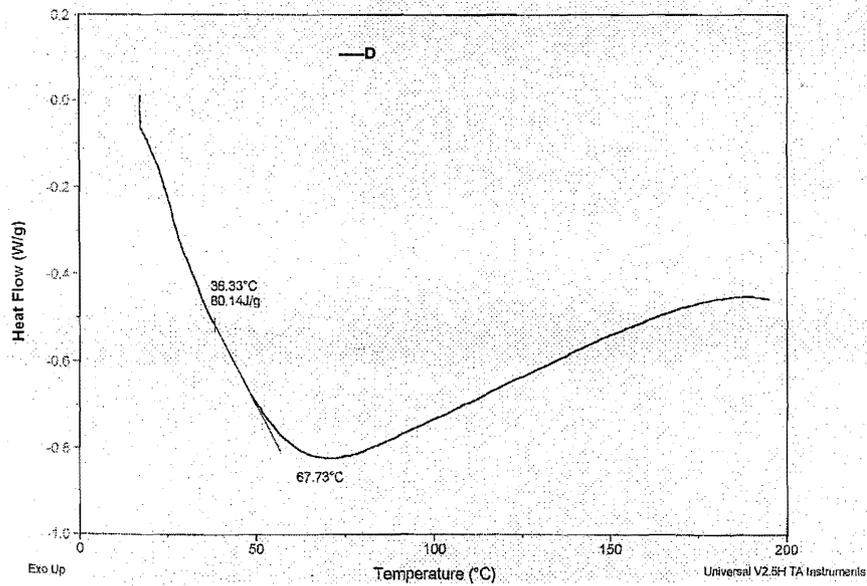


Figura 14 Termograma del colágeno D

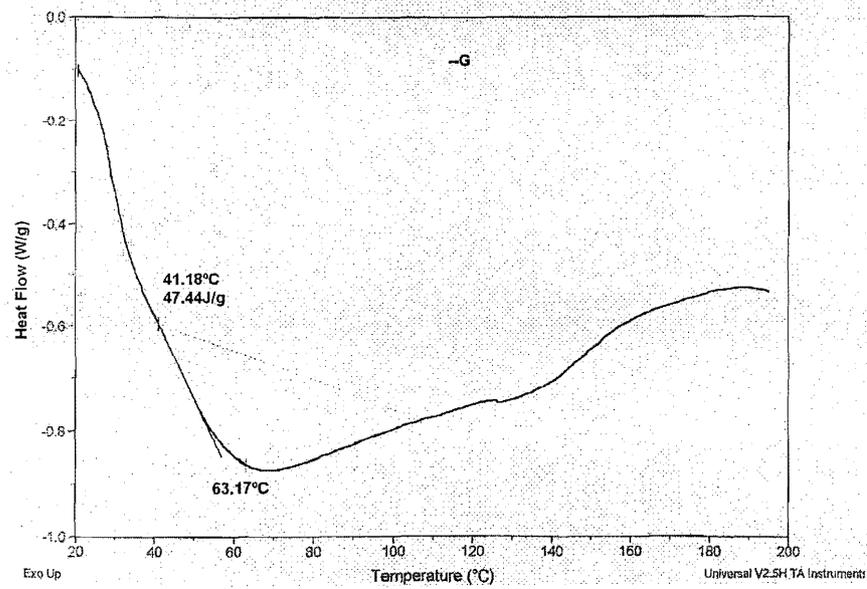


Figura 15 Termograma del colágeno G

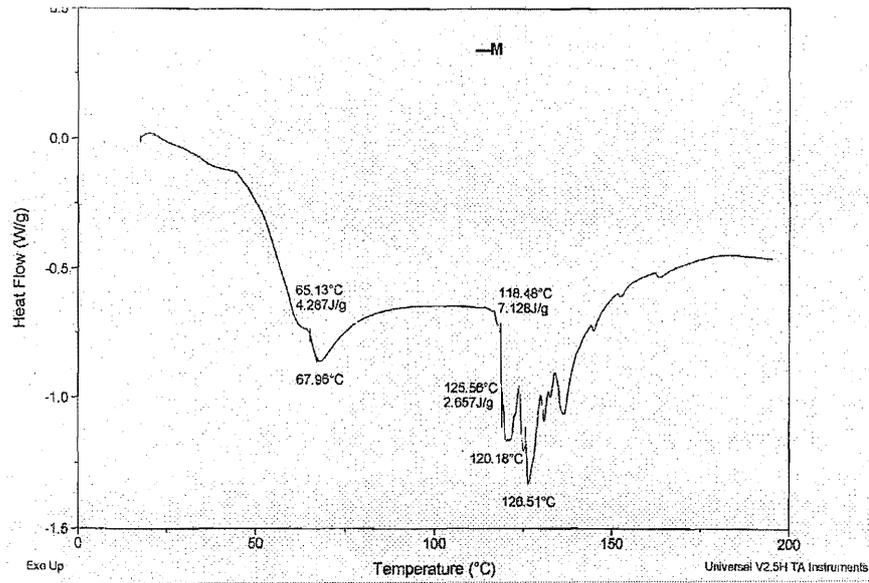


Figura 16 Termograma del colágeno M

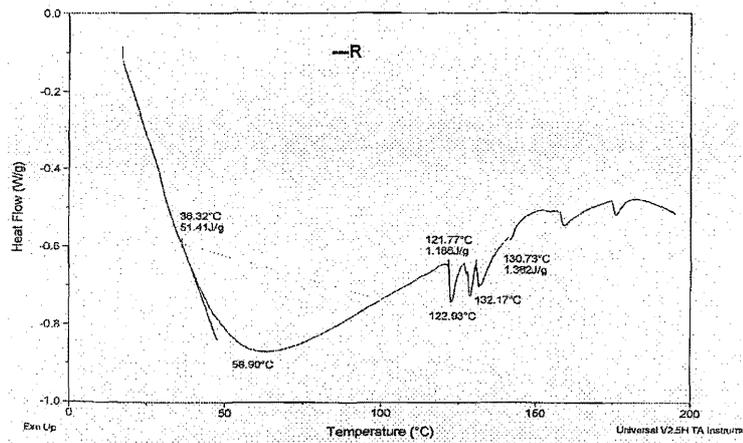


Figura 17 Termograma del colágeno R

4.3.- Identificación de grupos funcionales.

La espectroscopia de infrarrojo cercano es una poderosa herramienta para la identificación de los diversos grupos funcionales en muestras de composición desconocida utilizada por largo tiempo en diversos campos para el análisis de alimentos (productos cárnicos e identificación de grenetinas), de fósiles y muestras para análisis clínicos. La necesidad de monitorear el metabolismo y la regulación del colágeno en el cuerpo es deseable para detectar las situaciones patológicas como la presencia de tumores, diabetes mellutis, distrofia muscular, entre otras, esto ha generado la necesidad de desarrollar diversos métodos para su la cuantificación del colágeno que se caracteriza por su contenido de glicina, prolina y 5-hidroxilisina, hidroxiprolina, siendo esta última el principal parámetro que se detecta con métodos colorimetricos, cromatografía líquida de alta resolución, cromatografía de gas, espectrometría de masas, métodos enzimáticos y el infrarrojo cercano para que el tiempo de respuesta sea rápida y con una alta sensibilidad (Abdollahi *et al*, 2004; Kesava y Chuckukg, 1996; Linden *et al*, 1995; Oh y GroBklaus, 1995; Ramaswamy y Adams, 1977).

Oh Y GroBklaus (1995) realizaron un estudio comparativo entre los diferentes métodos de análisis de alimentos tradicionales para cuantificar, grasa, humedad, proteína, almidón y colágeno libre donde obtuvieron coeficientes de correlación muy similares entre cada uno alrededor de 0.96 -0.99.

Prácticamente todo lo que se sabe sobre la estructura de la materia proviene de la interacción de la materia con la radiación electromagnética y se denomina espectroscopia la que investiga los niveles de energía de átomos y moléculas con la ayuda de la mecánica cuántica. Los valores de los picos de absorbancia obtenidos de los colágenos estudiados A, B, D, G, M y R se muestran en la siguiente Tabla 17 y Figura 18.

Tabla 17 Longitud de onda obtenida del NIR colágeno A, B, D, G, M y R

Longitud de onda (nm)	Pico -#
1182	1
1518	2
1736	3
1946	4
2178	5
2278	6

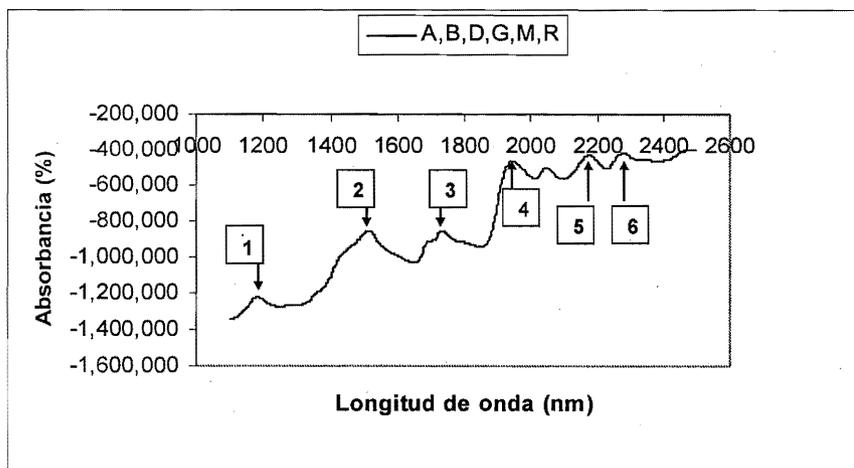


Figura 18 Infrarrojo cercano de los colágenos obtenidos.

Prácticamente todo lo que se sabe sobre la estructura de la materia proviene de la interacción de la materia con la radiación electromagnética y se denomina espectroscopia la que investiga los niveles de energía de átomos y moléculas con la ayuda de la mecánica cuántica.

Algunos compuestos heterocíclicos que derivan del pirrol por medio de un proceso de hidrogenación producen pirrolidina y estos al reaccionar dan lugar a la prolina y la hidroxiprolina, únicos amino ácidos procedentes de la hidrólisis de proteínas con grupo amino secundario. Los compuestos heterocíclicos tienen N, O, S y pueden presentar 3 tipos de frecuencias, su identificación se dificulta; sin embargo, las frecuencias características se muestran en la Tabla 16 y 17 (Devore, 1969; Domínguez, 1983).

Los grupos funcionales que destacan de la molécula de colágeno son el grupo pirrol, carboxilo, hidroxilo y amina secundaria (ya que esta última indica presencia de prolina e hidroxiprolina).

Tabla 18 Frecuencia características del infrarrojo de algunos compuestos heterocíclicos.

Compuestos	Rango e intensidad
Piridina (General)	3080-3020 (f-m)
	2080-1670(d)
	1615-1565(f)
	1030-990(f)
Pirrol	3480-3430 (l-f)
	3130-3120(d)
	1560-1390(variable)
	770-720(f l)

FUENTE : Lambert (1998)

Donde: f= fuerte ; m= medio, d= débil, l= ligero

Tabla 19 Frecuencia de algunos tipos de enlace.

Tipos de enlaces	Rango e Intensidad
C-N en aminas aromáticas	1280-1180 (f)
Anillo benceno en compuestos aromáticos	1515-1485 (m-f)
C=O	1750-1730(f)
Anillo de benceno sustituido	2000—1650(d)
-NH ₂ hidroxiluro de amina.	2750-2350(l)

FUENTE : Lambert (1998)

Donde: f= fuerte ; m= medio, d= débil ,l= ligero

De acuerdo con los datos que proporciona la bibliografía de la Tabla 18 y 19 se observa que 1182 pertenece al rango del enlace C=N; 1518 pertenece al Pirrol; y 1736 al C=O, por lo tanto si existe prolina e hidroxiprolina en las moléculas estudiadas. Los anillos de pirrolidina de la prolina y la hidroxiprolina imponen

restricciones conformacionales a las cadenas polipeptídicas y cooperan en la estabilidad de la triple hélice (Dominic y Wong, 1995).

4.4.-Identificación de la estructura de la molécula.

Los estudios sobre la configuración del colágeno se han realizado desde 1842 por Smith, pero fue hasta los años 40's y 50's del siglo pasado cuando se desarrollaron diferentes ideas y corrientes sobre la configuración y empaquetamiento con la ayuda de la micrografía electrónica. Astbury en 1940, Huggins en 1943, Ambrose y Eliot 1951 entre otros proponen estructuras que pueden ser considerados por la aparente inestabilidad de la fibra de colágeno; pero estos estudios fueron opacados por Paulin y Corey en 1951-1952 ya que ellos especificaron el criterio estereoquímico con el cual se limita el desarrollo de cualquier polipéptido propuesto, así su estructura es más satisfactoria, los autores se apoyaron con los resultados obtenidos por difracción rayos X y el microscopio electrónico. Se estableció que dos tipos de ligaduras contribuyen a la estructura secundaria y terciaria del colágeno, y que existen eslabones intermoleculares entre cruzados en las cadenas individuales (Rojas, 1979; Dominic y Wong, 1995; Fennema, 2000).

Como se puede observar en las Figura 19 la difracción de rayos X indica que la estructura de A, B, D, G, M son amorfas, es decir no son cristalinas y su rango de CPS oscila de 50 a 300; mientras que en la Figura 20 tenemos que los rangos oscilan desde 50 a 650 de CPS indica que la inactivación con ácido acético provoca una reorganización diferente de la molécula con un mayor peso molecular debido a que la temperatura no provoca una desnaturalización por lo tanto para obtener colágeno es mejor este método de inactivación y el otro para obtener grenetina.

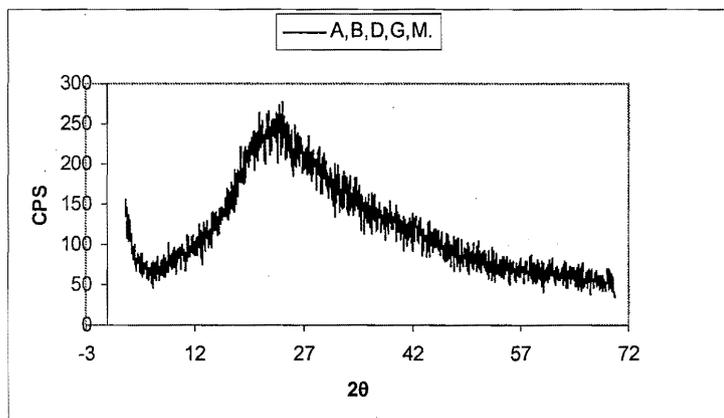


Figura 19 Difracción de Rayos X de los colágenos A, B D, G y M

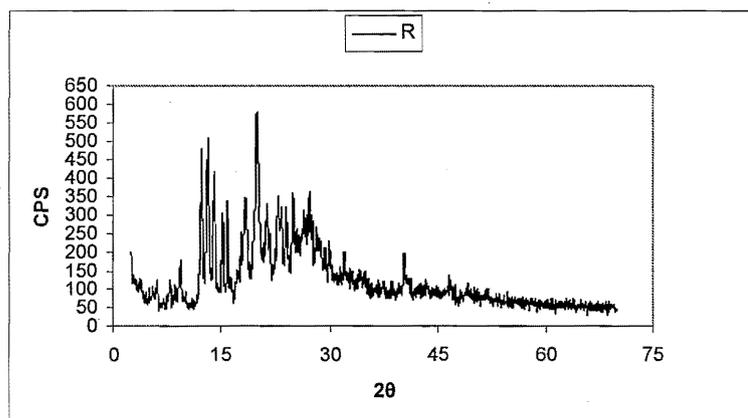


Figura 20 Difracción de Rayos X del colágeno R.

4.5.- Aplicación de las Películas de Grenetina a Frutos.

4.5.2.-Guayaba.

Los revestimientos comestibles son finas capas de material aplicado y formado directamente en la superficie del fruto que puede ser usado para sustituir o potenciar la cera de protección natural; así como sustituir materiales de embalaje sintéticos no comestibles que proporcionen una mayor vida. Los frutos conservados en atmósferas modificadas presentan pérdidas de peso muy inferiores contra los frutos sin película, siendo este parámetro decisivo en las cualidades de poscosecha.

En la Figura 21 se muestra el porcentaje de pérdida de peso donde se puede observar la película de grenetina provocó una ganancia de 1.3 % en el peso del primer día debido a que el fruto absorbió en su estructura a la película, mientras que para los frutos sin película existe una pérdida de peso del 8.3%. La pérdida de peso para el último día fue de 12.2% y 24.9%, respectivamente, lo que indica que detiene en aproximadamente un 50% la pérdida de humedad; que se ve reflejada en la disminución del diámetro de la Figura. 21 durante el transcurso del tiempo es menos drástica que para los frutos sin película existiendo una diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos.

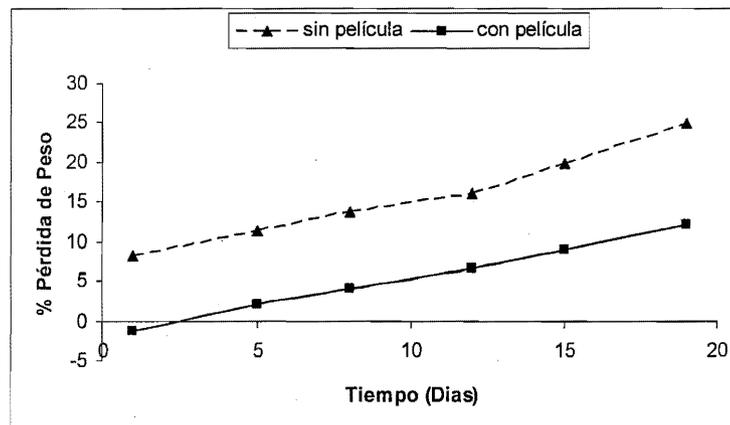


Figura 21 Pérdida de peso de la Guayaba

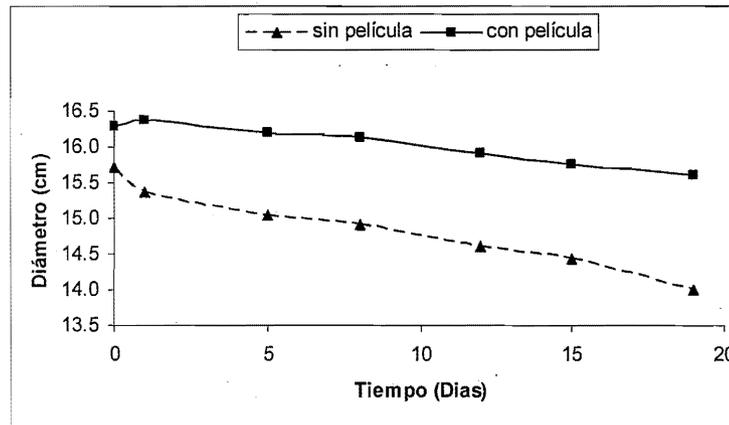


Figura 22 Diámetro de la Guayaba

El principal mecanismo de la pérdida de humedad de frutas y vegetales frescos es por el gradiente de la difusión del vapor de agua entre la fruta y del medio ambiente; donde el espesor y la permeabilidad de la película así como la temperatura y la humedad relativa son factores importantes ya que afectan a los estomas que son los organelos encargados de regular el proceso de transpiración y el intercambio de gases entre la fruta y el medio ambiente, siendo los responsables de la diferencia de presión de vapor entre el fruto y el medio ambiente; la respiración puede también causar una reducción en la humedad por la degradación del azúcar (Maftoonazad y Ramaswamy, 2004).

Esta tendencia es similar a la reportada en diversas frutas como mangos, uva, fresa, aguacate, litchi y kiwi; sin embargo el uso de películas biodegradables no tiene el mismo efecto y como ejemplo tenemos los trabajos reportados en tomates y en duraznos. (Amin *et al.*, 2001; Del Valle *et al.*, 2004; Giselle *et al.*, 2003; Huaqiang *et al.*, 2004; Maftoonazad y Ramaswamy, 2004; Pintado y Santos, 2002; Shiyong *et al.*, 2001; Simone *et al.*, 2003)

El color se debe principalmente a la degradación de clorofilas y permite la percepción de otros pigmentos que estaban en el cloroplasto o que se sintetizan de nuevo durante el proceso de maduración y provoca el color característico del fruto debido a la presencia de carotenoides (amarillo y rojo) flavoides (amarillo) y

antocianinos (rojo y azul) estos cambios tienen lugar principalmente en la piel y pulpa. (Badui, 1991; Arthey *et al.*, 1997; Tririlly *et al.*, 2002). Pueden ser medidos por diversos métodos, siendo el más conocido el de Hunter donde se tiene tres parámetros: L, a y b que dan lugar a la luminosidad, tonalidad y cromaticidad. En la Figuras 23, 24 y 25 se muestra evaluación del color en la piel de guayaba que fue evaluada en luminosidad, tonalidad y cromaticidad.

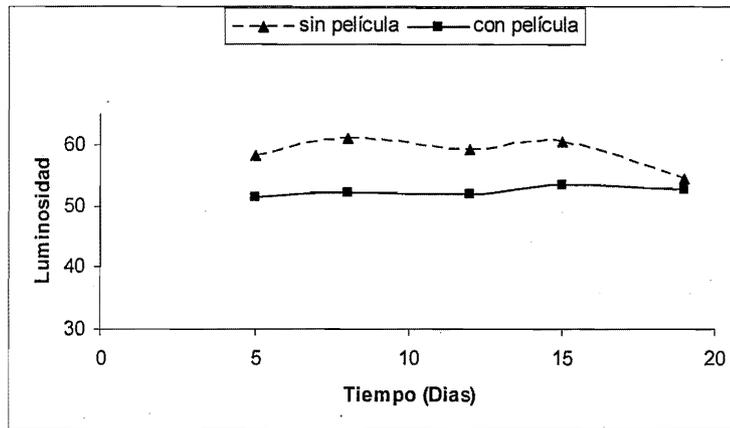


Figura 23 Luminosidad de la Guayaba

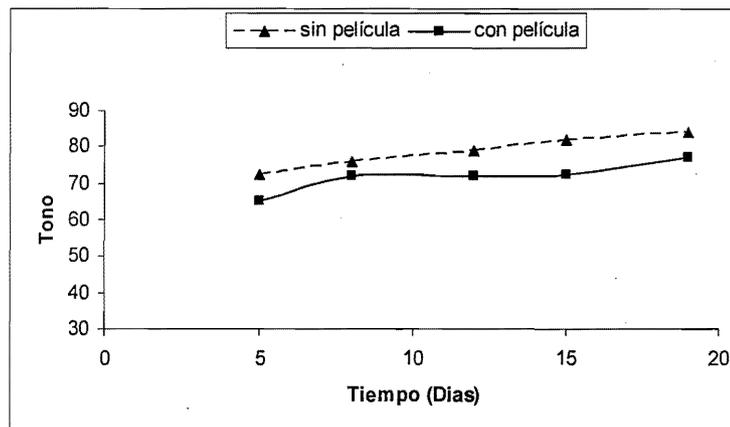


Figura 24 Tono de la Guayaba

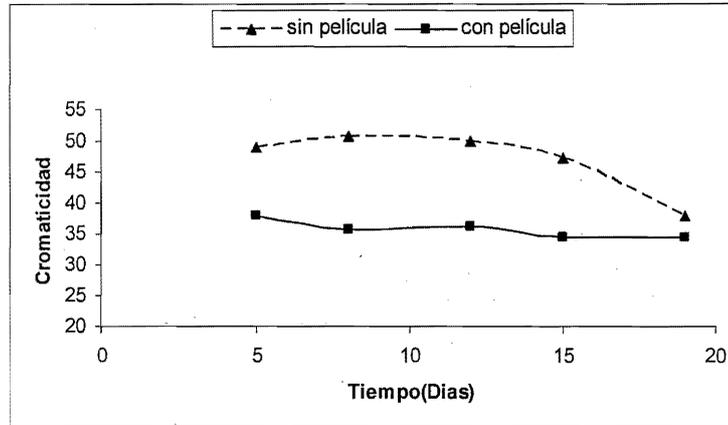


Figura 25 Cromaticidad de la Guayaba

La evaluación del color en la piel de la guayaba se ve afectada por la película y el tiempo de almacenamiento como se muestra en la figura 23, 24 y 25 y tenemos que para los valores de luminosidad a lo largo de la experimentación es mayor para el control siendo para el quinto día es de 60 y con película de 50, aunque es de 55 para el día 19, debido a que se presentaron manchas cafés alrededor del fruto en ambos casos.

Los valores obtenidos en el tono indican que hay retraso en la maduración del fruto ya que van de 65 y 70 para el quinto día y de 77 y 85 en el último siendo estos valores que demuestran la tendencia del color amarillo. Para el caso de la cromaticidad los valores son mayores a lo largo del tiempo de almacenamiento para el lote sin película que oscilan 38 y 49 a 34 y 39 para el último día con y sin película respectivamente, para estos tres parámetros entre los dos lotes existe diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre los frutos con películas y los frutos control.

Los bajos cambios de color en la fruta con la película comestible se relacionan con la modificación de la atmósfera de la fruta, donde la presencia de bióxido de carbono en el almacenamiento es un factor importante para prevenir la degradación de la clorofila como se ha demostrado con otros estudios en espárragos, brócoli y duraznos (Maftoonazad y Ramaswamy, 2004).

En la figura 26 se muestran los cambios de color externos de la guayaba durante los 19 días de almacenamiento, del lado izquierdo se muestran las guayabas control y del derecho con película, como se puede observar la película confiere brillantez así como un retraso en la maduración que se comprueba con el cambio de color y esta tendencia es durante el resto de la experimentación. A partir del quinto día se comienza a tener rasgos de un daño en el fruto, en ambos casos, debido tal vez a las condiciones ambientales de frío intenso del lugar de origen que se ven mas marcadas el día 19, motivo por el cual se detiene la experimentación.

RESULTADOS Y ANÁLISIS

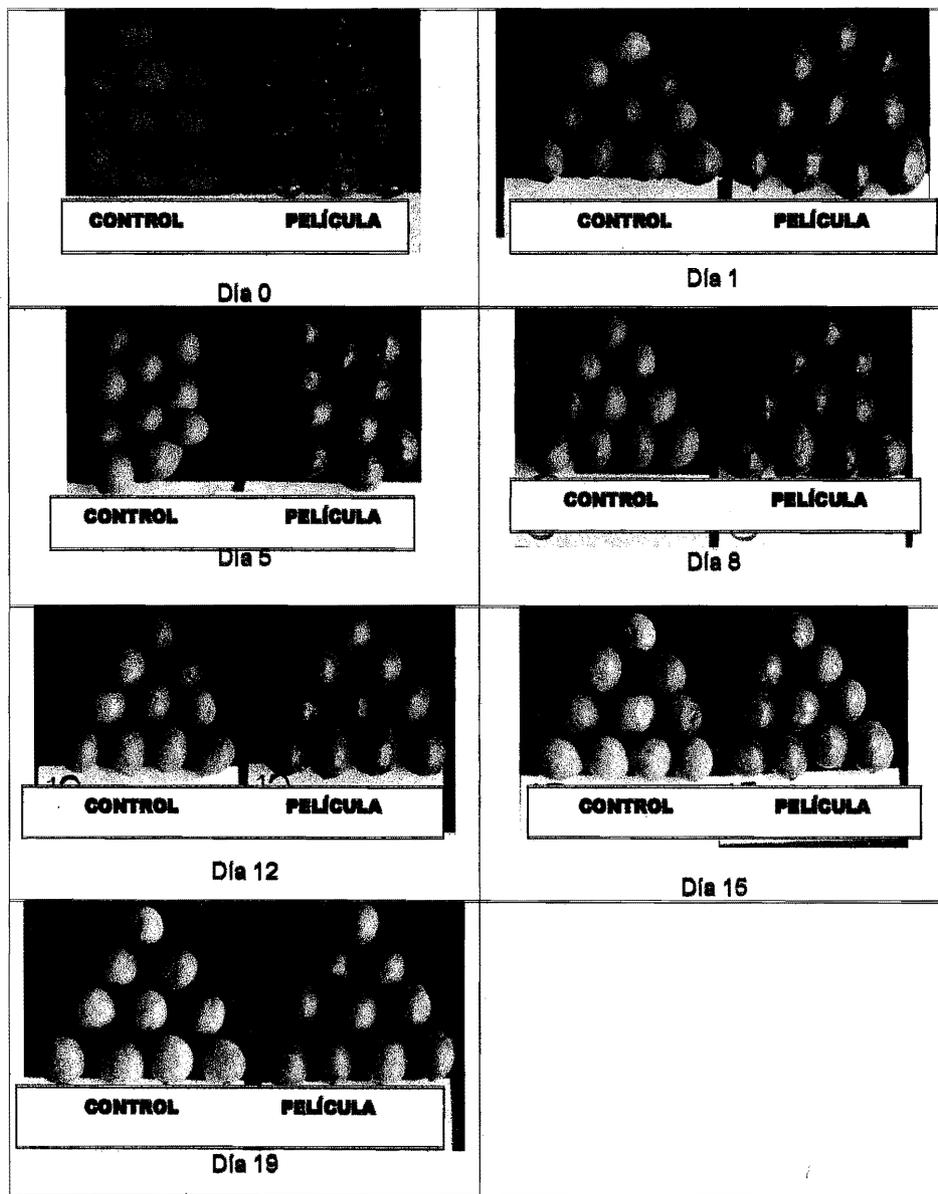


Figura 26 Cambios externos de color en la guayaba durante la experimentación.

La textura o firmeza es uno de los factores de calidad que más se estudian al ser producto de los pronunciados cambios asociados en la maduración. Los frutos inmaduros tienen en sus paredes celulares principalmente protopectina insoluble que mantiene juntas a las células, dando así la solidez del fruto ya que en el transcurso de la maduración la protopectina insoluble se transforma en pectina soluble que provoca el ablandamiento de los tejidos y favorece su comestibilidad. Durante la maduración de la fruta, la despolimerización de la silla de las sustancias pectídicas que ocurren cuando se incrementan la actividad de la esterase pectídica y la poligalacturasa, así como una baja concentración de oxígeno y una alta presencia de bióxido de carbono reducen las actividades de estas enzimas provocando que se mantenga la firmeza del fruto (Tririlly *et al.*, 2002; Salunkhe *et al.*, 1991).

En trabajos reportados por Simona *et al.* (2003) y Maftoonazad *et al.* (2004) no encontraron diferencia significativa en la textura con la aplicación de películas de mandioca en tomates ni en aguacates con películas de carboximetil celulosa, en ambos casos se encontró una diferencia de manera visual pero no fue apreciada por el instrumento de medición. Sin embargo para este estudio existe una diferencia significativa ($P \leq 0.05$) en el parámetro de firmeza en el transcurso del tiempo de almacenamiento entre los frutos con tratamiento y los controles como se muestra en la Figura 27.

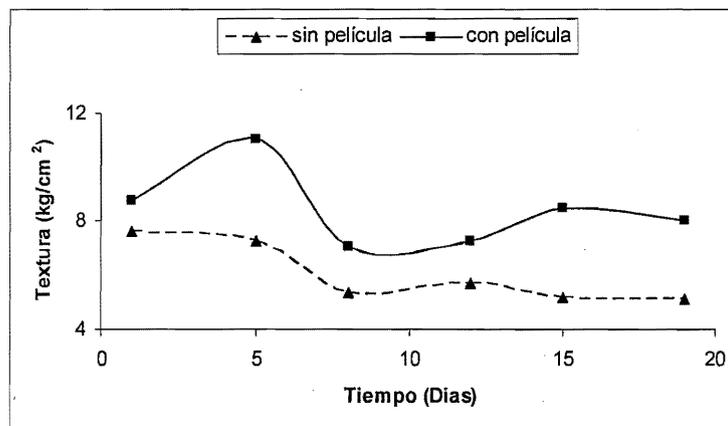


Figura 27 Influencia de la película en la firmeza de la Guayaba

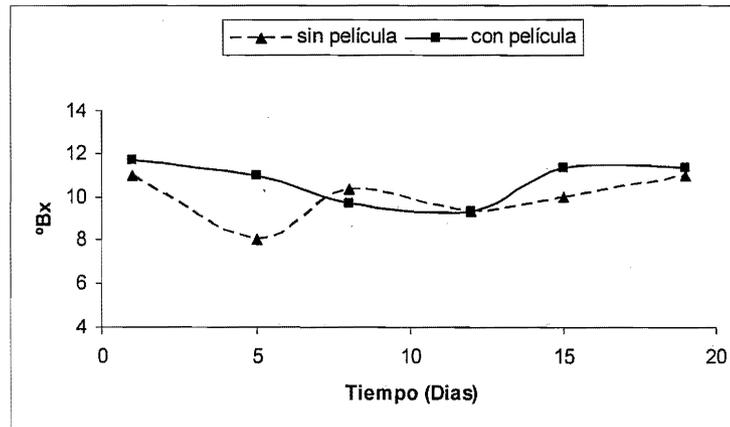


Figura 28 Sólidos Solubles de la Guayaba

En la Figura 28 se observan los cambios de los sólidos solubles de la guayaba con y sin película, encontrándose que no existe diferencia significativa, esta tendencia también fue encontrada en los trabajos realizados por Simona *et al.* (2003) y Shiyong *et al.* (2001) en tomate y kiwi. Sin embargo esto no sucede con la aplicación de la película de quitosan en litchi pelado y picado debido que hay un incremento de sólidos solubles.

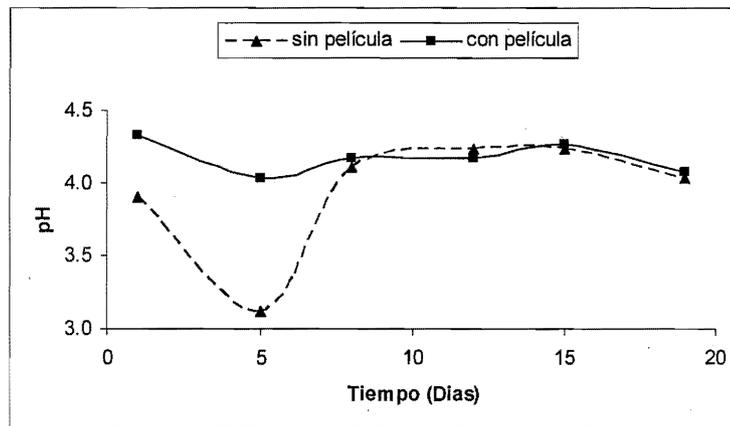


Figura 29 Efecto del pH de la Guayaba

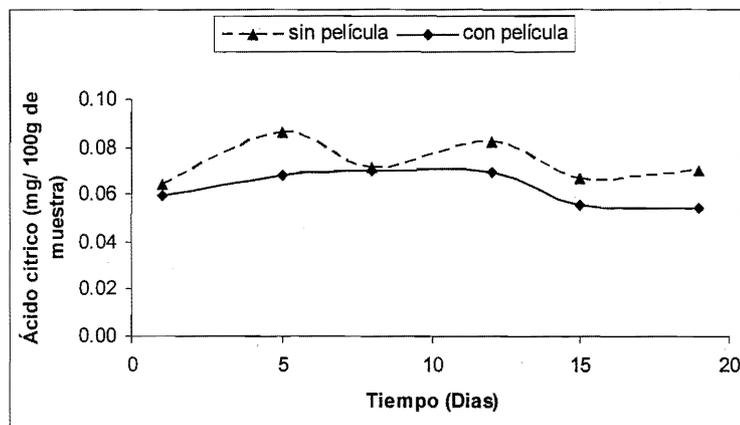


Figura 30 Acidez de la Guayaba

En los frutos los azúcares se incrementan conforme maduran y comienzan a disminuir únicamente tras alcanzar la maduración completa. Los principales ácidos contenidos en las frutas son el málico, tartárico y cítrico su porcentaje puede estar entre 0.4 –4 % que dependen del variedad y tipo de fruto; los ácidos de la fruta disminuyen en el transcurso de la maduración debido a que son utilizados en el metabolismo respiratorio o se transforman en azúcares (Arthey *et al.*, 1997).

El valor de pH es una medida que expresa la concentración de iones hidrógeno, siendo expresión del contenido de ácidos en el jugo, sin embargo es importante considerar la fuerza de los ácidos y la presencia de sustancias tampón como las sales minerales y esto implica que el pH corresponde más a la sensación de sabor que al contenido total de ácidos (Arthey *et al.*, 1997; Studer *et al.*, 1996; Tririlly *et al.*, 2002).

En la figura 29 se muestra los valores de pH, encontrándose que no existe diferencia significativa ($P \geq 0.05$) entre los frutos tratados y los controles. Resultados similares se reportan en trabajos realizados con kiwi y tomate, sin embargo contrastan con lo reportado en litchi, donde existe un alto contenido de ácidos orgánicos y de ácido ascórbico y se encontró un efecto por la aplicación de recubrimiento.

5.-Conclusiones.

Con base a los resultados del presente trabajo se concluye lo siguiente:

- ✓ El método de obtención por hidrólisis enzimática representa una buena opción para obtener el colágeno, debido a la ausencia de diversas sustancias químicas que se ocupan en los otros métodos y a que se requieren tiempos de obtención cortos y condiciones moderados de temperatura y pH las cuales influyen en la calidad del producto final obtenido con un peso molecular adecuado.
- ✓ Se ocupó la enzima (proteasa bacteriana) en su presentación líquida lo que facilita su dosificación e integración rápida al proceso; estas características permiten obtener una amplia gama de condiciones de proceso lo que repercuten en la obtención de productos con diferentes pesos moleculares.
- ✓ La eficiencia de degradación de la piel al aumentar la concentración de la enzima y la temperatura de obtención de gretina se incrementan, se mantiene la eficiencia a la misma concentración. Por otro lado para una misma concentración de enzima no se modifica la eficiencia en los tiempos estudiados.
- ✓ A menores temperaturas de inactivación de la enzima se tiene una molécula más ordenada de colágeno y de un mayor peso molecular. La evaluación de las temperaturas de transición a través de pruebas de calorimetría, muestra una la primera temperatura de transición dentro del rango de 59 a 75 °C que corresponde a una molécula de colágeno obtenido a partir de piel de mamíferos.
- ✓ El uso de infrarrojo cercano permitió identificar de manera rápida y eficaz los grupos funcionales que conforman a la molécula de colágeno entre los que se encuentran pirrol, carboxilo, hidroxilo y amina secundaria.

CONCLUSIONES

- ✓ Por medio de la Difracción de Rayos X se puede confirmar si la estructura de la molécula si es cristalina o amorfa. En caso de tener un sólido amorfo como en el caso de de grenetina o colágeno amorfo se tiene un patrón como el que se observa en la figura 19; y para una estructura cristalina se tiene un comportamiento similar al de la gráfica 20.

- ✓ La película de grenetina al 5% fue efectiva en la reducción de pérdida de peso de guayaba; ya que ayudó a retrasar su proceso de maduración permitiendo un retraso en la pérdida de firmeza y el color (cromaticidad, luminosidad y tono). se puede observar una disminución de la tasa de respiración del fruto, sin embargo, los otros parámetros de calidad no se vieron afectados por la aplicación de la película.

- ✓ Es importante tener una vinculación entre las empresas, el gobierno y el sector educativo para tener las bases suficientes y generar empleos en el país, así como generar la aplicación de la ciencia el desarrollo de una nueva tecnología que este al servicio de México.

6.- Recomendaciones sobre el trabajo.

- ✓ El uso de la grenetina o colágeno para la elaboración de películas comestibles es una opción de aplicación en alimentos, por lo que sería muy conveniente continuar con este tipo de investigaciones, además de mejorar la técnica de aplicación de la película y de investigar otros posibles cambios; así como el de su aplicación en diferentes estados de maduración de frutos que presenten una vida útil corta.
- ✓ Así como estudiar las propiedades de la película como permeabilidad al vapor de agua, el etileno, el dióxido de carbono, oxígeno y la estabilidad térmica.
- ✓ Se recomienda además que se tenga un convenio con productores para mantener la calidad constante del fruto, para tener una misma calidad en la grenetina se recomienda tener un solo proveedor.

7.-Bibliografía.

- ✓ Abdollahi H, Nemati, Oveisi M.R., Sabzevari O. (2004). Differentiation of bovine and porcine gelatins using principal component analyses, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analyses*, **34**, pp. 485-492.
- ✓ Anónimo (2004). Curso de Doctorado: Innovaciones a la refrigeración de productos vegetales. *Empaque y películas biodegradables y/o comestibles para alimentos*, pp.24-44.
- ✓ Amin, A; Ali,M.; Ahmed,A.; Mahmood-ul-Hassan. (2001) Effect of coatings and polyethylene sheet on the shelf life of mangoes (*Mangifera indica* L.) Pakistan-*Journal-of-Arid-Agriculture*, **4**, pp. 7-13.
- ✓ Arroyo Miguel (1998). Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones, *Ars Pharmaceutica* **39:2**; pp. 23-39.
- ✓ Arthey D y Ashurt St. P (1997). *Procesado de frutas y Hortalizas*, Editorial Acribia, España, pp. 591
- ✓ ASERCA, (1995). El limón Persa y el limón mexicano: la complementariedad del Mercado, SAGARPA, México pp. 24-30.
- ✓ ASERCA, (1996). Estudio del mercado mundial de la guayaba, SAGARPA, México pp. 34-44.
- ✓ Atkins P.W, (1986). *Fisicoquímica*. Fondo Educativo Interamericano. México, pp. 969.
- ✓ Badui Dergal Salvador (1991), *Química de los alimentos*, Editorial Alahambra Mexicana, México, pp. 648.
- ✓ Bailey Allen J y Light Nicholas (1989). *Connective Tissue in meat and meat products*, Ed. Elsevier Applied Science, London, pp. 355.
- ✓ Ball David, (2004). *Fisicoquímica*, Editorial Thomson, México, pp. 837.
- ✓ Bosques Molina Elsa, (2004). Desarrollo de recubrimientos comestibles formulados con goma de mezquite y cera de candelilla para la conservación de frutas, UAM Iztapalapa, México, pp. 1-14.
- ✓ Camacho F, Guadix A., Guadix E, Páez Dueñas M.P y González-Tello P. (2000). Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas, *Ars Pharmaceutica*, **41**, pp. 79:89.

- ✓ Castellan, Gilbert W. (1998). *Fisicoquímica*, Editorial Addison Wesley Longman, México, 2ª, pp. 866.
- ✓ De Man M. *Principles of Food Chemistry*, Editorial AN ASPEN PUBLICATION, USA, 3a, pp. 520.
- ✓ Del Valle V.; Hernandez P.; Guasda A.; Galotto M. (2004). Development of a cactus-mucilage edible coating and its application to extend strawberry shelf-life, *Food Chemistry*, **7**, pp. 1-6.
- ✓ Devore B. (1969). *Química Orgánica*, Editorial Publicaciones Cultural, México, pp. 734.
- ✓ Dominic y Wong (1995). *Química de alimentos*, Editorial Acribia, España, pp. 474
- ✓ Domínguez Xorge A. (1992). *Química Orgánica*, Editorial CECSA., México, pp. 427.
- ✓ Dumas H, Tardy M, Tayo JL, Rocht HH, Verain A. (1989). Technique du prilling adaptée á des Solutions de Collagene, *Congres International de Technology Pharmaceutic*, Juin, Paris.
- ✓ Fennema Owen (2000). *Química de alimentos*, Editorial Acribia, España 2ª, pp. 1258.
- ✓ Forrest J. (1986). *Fundamentos de la ciencia de la carne*, Editorial Acribia, España pp. 364.
- ✓ Giselle de Assis Jacometti; Renata Fraxino de Almeida Meneghel; Fábio Yamashita, (2003). Use of edible coating in peachs, *Alimentaria*, **23**, pp. 1-20.
- ✓ Glicksman Martin (1959). *Gum Technology in the food industry*, Editorial New Cork Academic, USA, pp. 590.
- ✓ González Méndez Natalia and Vázquez Ortiz Francisco, (1996). Determination of collagen as a Quality Index in Bologna from Northwestern Mexico, *Journal of Food Composition and Analysis*, **9**, pp. 269-276.
- ✓ Huaqiang Dong, Liangying Cheng, Jiahou Tan, Kunwang Zheng, Yueming Jiang (2004). Effects of chitosan on quality and shelf life of peeled litchi fruit, *Journal of Food Engeneering*, **64**, pp. 355-358.
- ✓ Kesava R. y Chukuka S. (1996). A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tisúes, *Clinical Biochemistry*, **29:3**, pp. 225-229.

BIBLIOGRAFIA

- ✓ Lambert y et al, (1998). *Organic Structural Spectroscopy*, Ed. Prentice Hall, USA pp. 1364.
- ✓ Lan Laing Michael (2000). *Una Introducción a la Cobertura, Potencial y Aplicaciones del Análisis Por Rayos-X*, Departamento de Química, Universidad de Natal, Sudáfrica Trad. Oscar Coreño Alonso et al col. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México, pp. 30-60.
- ✓ Linden G y Lorient D. (1996). *Bioquímica Agroindustrial. Revalorización alimentaria de la Producción Agrícola*, Editorial Acibia, España, pp. 248.
- ✓ López Vega Damián, (2003). Caracterización de películas compuestas de quitosan para proponer una alterativa que alargue la vida útil del aguacate, Tesis Licenciatura Ingeniería en alimentos, FES Cuautitlán, UNAM pp. 120.
- ✓ Maftoonazad N.; Ramaswamy H. (2004). Postharvest shelf-life extensión of avocados usisg methyl cellulose-based coating, *Lebensm.-Wiss. U-Technology*, **3**, pp. 330-338.
- ✓ Mc Murry John, (2001). *Química Orgánica*, International Thomson Editores, México, 5a, pp. 1284.
- ✓ Mitchel J.R. y Ledward D.A., (1986). *Functional Propieties of Food Macromolecules*, Editorial Elsevier applied science Publishing, U.S.A, pp. 334.
- ✓ Morimura S., NagataH., Uemura Y., Fahmi A., Shigematsu T. y Kida K. (2002). Developed of an effective process for utilization of collagen from livestock and fish waste, *Process Biochemistry*, **3**, pp. 1403-1412.
- ✓ Morrison y Boy. (1990). *Química Orgánica*, Editorial Addison Wesley Iberoamericana, México, 5ª, pp. 1370.
- ✓ Murray R, Graner D, Mayes P, y Rodwell V. (1991). *Bioquímica de Harper*, Ediciones Manual Moderno, México, 23ª, pp. 1020.
- ✓ Ochoa Diez Pilar, (2000). Colágeno Nativo: Una Pequeña Revolución *Estética, Farmacéutica*, **1**, pp. 38-45.
- ✓ Ockerman H.W. y Hansen C.L. (2000). *Animal by -Products processing and utilization*, Editorial CRC PRES, London, pp. 387.
- ✓ Oh E. y GroBklaus D. (1995). Measurement of the components in meat patties by near infrared reflectance spectroscopy, *Meat Science*, **41:2**, pp. 157-162.

- ✓ Pintado, C.; Santos, A. (2002). Edible films in the conservation of "Red Globe" dessert grapes, *Associação Portuguesa de Horticultura*, Lisbon, **181**, pp. 137-141.
- ✓ Poppe J. (1997). Gelatin en: Imeson Alan *Thickening and Gelling Agents for Food*, Editorial Blackie Academic and Professional, London, 2a, pp. 145-168.
- ✓ Ramaswamy S, y Adams E.(1977). One-Vessel synthesis of 4-hydroxyproline from glyoxal and oxaloacetic acid, *Journal Organic Chemistry*, **42:21**, pp. 3440-3442.
- ✓ Ratule M (2001). Characteristic, technique, and performance of edible package application in lengthening fresh fruits and vegetables storage time, *Jurna- Pengkajian-dan-Pengembangan- teknologi-Pertanian*, **2**, pp. 35-42.
- ✓ Robinson David. (1991). *Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos*, Editorial Acribia, España, pp. 330.
- ✓ Rojas Ponce Enrique (1979). Monografía de colágeno y sus aplicaciones, Tesis Licenciatura Química, Facultad de Química UNAM pp. 69.
- ✓ Rosa C.S., Terra N.N. y Kubota E. H., (2002) Obtención del aislado de colágeno de la piel de pollo, *Alimentaria*, **334**, pp. 67-71.
- ✓ Sener Friedrich, Scherz Heime, Manchen Garching (1999). *Tabla de composición de los alimentos*, Editorial Acribia, España, pp. 550.
- ✓ Shiyong Xu, Xiufang Chen, Da-Wen Sun (2001). Preservation of kiwifruit coated with an edible film at ambient temperature, *Journal of Food Engineering*, **50:4**, pp. 211-216.
- ✓ Serra Baldrich Noemí (2000). Actualidad dermatológica, *Colaboraciones*, España pp. 25-28.
- ✓ Simone Damasceno; Patricia Vieira Sutil de Oliveira; Edemar Moro; Eurides Küster Macedo Jr.; Mário César Lopes; Nívea Maria Vicentini(2003). Application of cassava starch film effect in the tomato postharvest conservation, *Alimentaria*, **23:3**, pp. 1-10.
- ✓ Studer Arnold, Ulrich Daepf Hans, y Suter Edih. (1996). *Conservación de frutas y hortalizas*, Editorial Acribia, España, pp. 440.
- ✓ Stryser Lubert (1995). *Bioquímica*, Editorial Reverte, Tomo 1, España, 4ª pp. 591.

BIBLIOGRAFIA

- ✓ Tirilly Yves y Marcel Bourgeois Claude (2002). *Tecnología de las hortalizas*, Editorial Acribia, España pp. 541.
- ✓ Trejo Márquez María Andrea (2000). *Estudio de factores fisiológicos y bioquímicos relacionados con los daños por el frío en plátano*, Tesis Doctorado, Universidad Autónoma de Barcelona, España pp. 110.
- ✓ Varios Autores (2000). *Manual MT*, México pp. 60.
- ✓ White Abraham, Handler Philip, Smith Emil, Hill Robert, Lehman Robert, (1978). *Principios de Bioquímica*, Editorial Mc Graw Hill, España, 2ª pp. 1185.
- ✓ Yi Wu Curtis, Weller Fayrene Susan, Cuppett Marilyn Schnepf (2002). Development and application of multicomponent edible coatings and films: A Review, *Advances in Food and Nutrition Research*, **44**, pp. 347-394.

7.1.- Páginas Web Consultadas.

- ✓ Gobierno de Bolivia. Apoyo a pequeñas industrias.(2004) disponible en:
<http://www.boliviacompetitiva.org/cadenas/documentos/Recopilacion/Cuero%20y%20Manufacturas.pdf> consultado el 8 de Marzo de 2004.
- ✓ Cantera Carlos Santos y Bértola Carlos Enrique. Valorización de Residuos Sólidos en la Industria Curtidora. (2004) Disponible en:
<http://www.cepis.org.pe/eswww/repamar/gtzproye/valoriz/valoriz.html#II>.
consultado el 8 marzo 2004.
- ✓ Dolores net disponible en:
<http://www.doloresnet.com/Agro/Hacienda/Subproductos.htm> consultado 14 Feb 2005.
- ✓ Mercado Rodríguez Fernando, Ignacio Caanal Cauich, Jeronimo Ascencio Felipe (2004) Guayaba Disponible en:
<http://www.chapingo.mx/investigacion/pronisea/pro10.html> consultado el 16 de Octubre de 2004.
- ✓ La Comunidad del cuero disponible en:
<http://www.cueronet.com/tecnica/tipospieles.htm> consultado 11 junio 2004.
- ✓ Colageno disponible en:
<http://www.farmaflora.com.br/literaturas/colageno.htm> consultado el 17 de mayo 2004.
- ✓ Gelatina disponible en:
- ✓ <http://www.gelatine.org> consultado el 17 de Septiembre del 2004.
- ✓ The Grupo Gelita disponible en: <http://www.gelita.com> consultado el 17 de Septiembre del 2004.
- ✓ Gelatin Manufactures Association of Asia Pacific disponible en:
http://www.gmap-gelatin.com/how_made.html consultado el 17 de Septiembre del 2004.
- ✓ Adel A. Kader University of California, Davis. Postharvest Technology Guayaba disponible en:
<http://rics.ucdavis.edu/postharvest2/Produce/ProduceFacts/Espanol/Guayaba.shtml> consultado el 16 de Octubre 2004.

- ✓ Gregory Brust. Differential Scanning Calorimetry. Disponible en: <http://www.pslc.ws/spanish/dsc.htm> consultado 4 de Agosto 2004.
- ✓ Principios de Física disponible en: <http://www.vestibulandoweb.com.br/fisica/calorimetria.htm> consultado 4 de Agosto 2004.
- ✓ Gregory Brust Infrared Spectroscopy disponible en: <http://www.pslc.ws/spanish/ir.htm> consultado el 4 de Agosto de 2004.
- ✓ Gregory Brust Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy disponible en: <http://www.pslc.ws/spanish/nmr.htm> consultado 4 agosto 2004
- ✓ SAGARPA (2005) disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/CNAbov.htm> consultado el 13 de Febrero del 2005.
- ✓ La enciclopedia libre disponible en: <http://es.wikipedia.org> consultado 4 de Agosto 2004.
- ✓ INEGI. Disponible en: <http://www.ganaderia.com.mx/estadisticas/?s=estadistica&tema=estad24-04> consultado el 13 de Febrero del 2005.
- ✓ INEGI disponible en: <http://www.ganaderia.com.mx/estadisticas/?s=estadistica&tema=estad06-04> consultado 13 de Febrero del 2005.
- ✓ SAGARPA disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/CNAbov.htm> consultado el 13 de Febrero del 2005.
- ✓ SAGARPA disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/DPcar.htm> consultado el 13 de Febrero del 2005.
- ✓ SAGARPA disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/DPcar.htm> consultado el 13 de Febrero del 2005.
- ✓ INFOASERCA disponible en: http://www.infoaserca.gob.mx/bovinos/gb_subproductos.asp consultado el 13 de Febrero del 2005.
- ✓ SNIIM disponible en: http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ar_commarqcomer.html consultado el 13 de Febrero del 2005.

8.- Anexos.

8.1.- Anexo A Proceso de curtido.

a) Proceso de Ribera

El proceso de ribera comprende las operaciones de recepción de piel, salado o curado, remojo y/o lavado, pelambre, descarnado y dividido. Su objetivo es preparar la piel para el curtido limpiándola y acondicionándola, además de asegurar la humedad requerida para los subsiguientes procesos. Se calcula que alrededor del 50% del consumo de agua de la curtiembre es empleado en esta etapa. A continuación se describe las operaciones de ribera.

✓ Recepción de pieles

Las pieles pueden llegar a la curtiembre sin acondicionamiento alguno como pieles "frescas", o por el contrario tratadas con sal como "frescas saladas" o "secas saladas". En algunos países se reciben las pieles directamente de los mataderos así como de rescatadores o intermediarios. Dada la escasez de pieles en el mercado, no hay mucha exigencia en cuanto a su calidad. Esto hace que su manejo, en la ganadería y en el faenado, no sea el más adecuado, lo que trae consigo una menor superficie de piel aprovechable.

✓ Remojo y/o Lavado

El remojo puede efectuarse en pieles frescas, frescas saladas y secas saladas. A las pieles frescas se las lava o remoja por períodos muy cortos. Los principales objetivos de esta operación son:

- ✓ Limpiar la superficie de la piel de sangre, estiércol, tierra, sal, etc.
- ✓ Rehidratar la estructura de la piel.

✓ Pelambre

El objetivo de esta operación es, por una parte, depilar la piel, eliminando el material hecho de queratina (pelo, raíces de pelo y epidermis); y, por otra, encalar la piel, a fin de hincharla en forma homogénea y prepararla para el curtido, removiendo al mismo tiempo algunas albúminas, muco-polisacáridos y grasas. En la producción de cuero curtido que conserva el pelo (destinado a marroquinería para carteras o forros de

muebles y vehículos), la operación de pelambre se reduce simplemente a una operación de encalado.

✓ Descarnado y dividido.

El descarnado es la operación que separa, por corte mecánico, los residuos de carne, grasa subcutánea y tejido conectivo de la piel.

En la operación de dividido se emplea una máquina divisora y, como su nombre lo indica, las pieles son divididas en flor (parte externa) y costra (parte interna). Por lo general, el dividido se realiza después de la operación de pelambre y previo a la operación de desencalado. Esta secuencia operativa es la más conveniente, ya que una piel más delgada absorbe mejor los reactivos químicos durante la operación de curtido.

b) Proceso de Curtido

El proceso de curtido comprende las operaciones de desencalado, purgado, desengrasado, piquelado y curtido. En estas operaciones, existen variaciones significativas en cuanto a la dosificación de insumos y de reactivos químicos, que dependen del tipo de piel a procesar, del producto requerido y del método empleado. A continuación, se describe las operaciones más comunes del proceso de curtido, así como la magnitud de cada rango de las variables más importantes para cada una de dichas operaciones.

✓ Desencalado y purgado

La piel debe ser acondicionada antes de ser sometida a la operación de curtido. Este acondicionamiento comprende las operaciones de desencalado y purgado. El desencalado es la neutralización parcial de la piel, cuyo objetivo es detener su hinchamiento y remover el sulfuro y la cal presentes, mediante lavados con agua y la adición de reactivos químicos (por lo general se utiliza cloruro y/o sulfato de amonio, bisulfito de sodio y, en algunos casos, agentes tensoactivos.), que ayudan a eliminar el exceso de cal.

El purgado tiene como objetivo eliminar las proteínas no colágenas remanentes en la piel, incluyendo algunas raíces de pelo remanentes, a fin de mejorar la textura del cuero.

✓ Desengrasado

El desengrasado tiene como objetivo remover las grasas remanentes de la piel, debido a que éstas reaccionan con el cromo para formar jabones insolubles, indeseables en el curtido. Se aplica sobre todo a aquellas pieles con alto contenido de grasas. El proceso puede aplicarse en diferentes etapas de la manufactura del cuero.

✓ Piquelado

El piquelado tiene como objetivo llevar las pieles al pH requerido para el curtido (pH final entre 2.8 a 3.5) y, al mismo tiempo, detener cualquier tendencia al hinchamiento ácido. Normalmente, se emplea cloruro de sodio y ácido sulfúrico y/o ácido fórmico. Como las pieles piqueladas y curtidas son almacenadas muchas veces durante lapsos de tiempo largos, a veces más de un año, se requiere añadir un fungicida al baño de piquelado.

✓ Curtido

El curtido tiene el propósito de convertir las pieles en material no putrescible. Los agentes curtientes se fijan en las fibras de colágeno, estabilizándolas a través de uniones cruzadas (es decir, uniones químicas entre fibras). Dependiendo del tipo y cantidad del curtiente añadido a las pieles, se produce diferentes tipos de cueros. Los tipos de curtido más practicados son al cromo y al tanino, dependiendo del producto a obtener.

✓ Post Curtido

El postcurtido comprende las operaciones después del curtido:

a) *Escurrido*: Es un tratamiento mecánico, a presión o por escurrimiento natural, para eliminar gran parte de la humedad del wet blue.

b) *Rebajado*: Es una regulación mecánica del espesor del cuero. Representa la mayor cantidad de generación de residuos sólidos con alto contenido de humedad.

c) *Neutralización*: Es una operación en húmedo para elevar el pH ácido del cuero mediante la adición de sales como el formiato de sodio o el bicarbonato de sodio.

d) *Recurtido*: Es un curtido suplementario que da las propiedades finales al cuero. Dependiendo del tipo de producto que se espera obtener, las operaciones aplicadas varían p.ej. si se desea mayor dureza se recurte con tanino; si se desea mayor soporte y cuerpo se añaden recuertientes, etc.

e) *Teñido*: Sirve para dar color al cuero. Generalmente se realiza en el mismo baño del recurtido, con agentes químicos como las anilinas, y empleando amoníaco como agente penetrante

f) *Engrasado*: Le da mayor suavidad al cuero. Se usan engrasantes sintéticos y naturales.

g) *Secado*: El secado puede ser realizado al aire libre o por aplicación de calor mediante máquinas. El secado al aire, si bien no consume energía, está sujeto a condiciones climáticas variables (como temperatura y humedad). El secado forzado es más versátil, pero requiere de un uso intensivo de energía.

d) *Acabado*

Las operaciones de acabado le otorgan al cuero mayor brillo, color, resistencia a la luz, mejorando la calidad del mismo, mediante la incorporación de ciertos aditivos como pigmentos (caseínicos), ligantes acrílicos, cera, penetrante y otros. Las formulaciones para el acabado varían ampliamente dependiendo del tipo de cuero que se desea y por ello no son detalladas en este texto.

(<http://www.boliviacompetitiva.org/cadenas/documentos/Recopilacion/Cuero%20y%20Manufacturas.pdf>; <http://www.cueronet.com/tecnica/tipospieles.htm>.)

8.2.- Anexo B Calorimetría.

La calorimetría es la parte de física dedicada a la medida de las cantidades de calor que intervienen en distintos fenómenos. La mayoría de las reacciones químicas se producen con desprendimiento o absorción de calor y se dividen, respectivamente, en reacciones exotérmicas y endotérmicas, según que haya calentamiento o enfriamiento durante la reacción, si aumenta o disminuye la temperatura (T) de un cuerpo, se dice que este ha recibido o cedido cierta cantidad de calor. La cantidad de calor recibida por un cuerpo puro es proporcional a la masa del mismo en la cual produce una variación de temperatura determinada.

Se utilizan tres métodos calorimétricos:

El método de mezclas o el método adiabático, la cantidad de calor, positiva o negativa, que hay que medir se evalúa a partir de una masa de agua M, cuya temperatura se eleva (o disminuye) de T a T'. La expresión de esta cantidad de calor será:

$$Q = M (T' - T).$$

El método de fusión de hielo o método isotérmico, esta cantidad de calor sirve para fundir cierta masa de hielo, que le es proporcional, y se calcula la disminución de volumen de hielo fundido.

En el método eléctrico, el paso de una corriente a través de un conductor proporciona una cantidad de calor determinada que sirve para producir el efecto calórico (por ejemplo una variación de temperatura).

(<http://www.vestibulandoweb.com.br/fisica/calorimetria.htm>;

<http://www.pslc.ws/spanish/dsc.htm>)

✓ Calorimetría diferencial de barrido.

La calorimetría diferencial de barrido es una técnica que se emplea para estudiar qué ocurre cuando un polímero es calentado. Se utiliza para analizar lo que se llama la *transición térmica* de un polímero; qué son los cambios que tienen lugar en un polímero cuando se calienta. La fusión de un polímero cristalino es un ejemplo. La *transición vítrea* es también una transición térmica.

Se calienta la muestra del polímero en un dispositivo similar a éste:

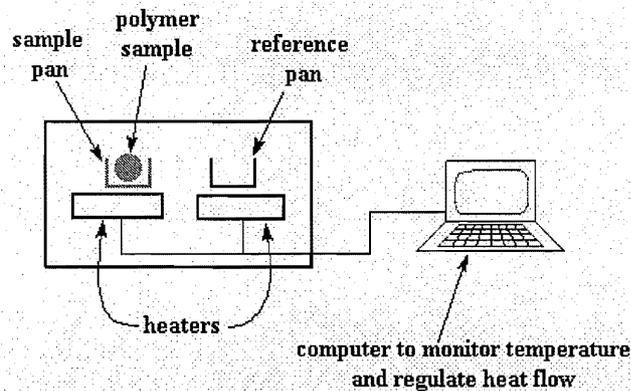


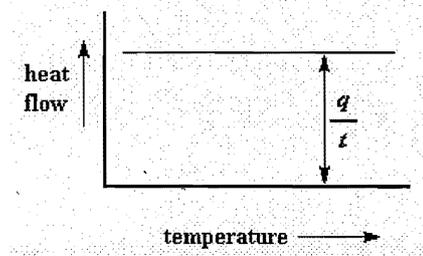
Figura 32 Sistema del calorímetro.

Se tienen dos platillos, en uno de ellos, se coloca la muestra polimérica, el otro es de referencia el que está vacío cada platillo se apoya sobre la parte superior de un calefactor y se ordena a la computadora que ponga en funcionamiento los calefactores, enciende los calefactores se que calientan los platillos a una velocidad específica, generalmente a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ por minuto. La computadora se asegura totalmente de que la velocidad de calentamiento sea exactamente la misma a lo largo de todo el experimento.

Pero lo que es más importante, se asegura de que los dos platillos separados, con sus dos calefactores separados, se calienten a la misma velocidad. La razón por la cual se deben de calentar a la misma velocidad es que los dos platillos son diferentes. Uno contiene un polímero y el otro no. La muestra polimérica implica que hay material extra en el platillo de la muestra. Y tener material extra significa que hará falta más calor para lograr que la temperatura del platillo de la muestra, aumente a la misma velocidad que la del platillo de referencia. De modo que el calefactor situado debajo del platillo de la muestra, debe trabajar más intensamente que el calefactor que está debajo del platillo de referencia. Tiene que suministrar más calor. Lo que se hace en una experiencia de DSC, es medir *cuánto* calor adicional debe suministrarse y se traza una curva a medida que la temperatura se incrementa. Sobre el eje x se grafica la temperatura, sobre el eje y la diferencia de producción de calor entre los dos calefactores, a una dada temperatura.

Capacidad Calorífica.

Cuando se comienzan a calentar los dos platillos, la computadora registrará la diferencia de producción de calor entre los dos calefactores versus temperatura. Esto significa se grafica el calor absorbido por el polímero en función de la temperatura. Al principio, la curva se verá así:



El flujo de calor va a ser expresado en unidades de calor q , suministrado por unidad de tiempo, t . La velocidad de calentamiento es el incremento de temperatura T , por unidad de tiempo, t .

$$\frac{\text{heat}}{\text{time}} = \frac{q}{t} = \text{heat flow}$$

$$\frac{\text{temperature increase}}{\text{time}} = \frac{\Delta T}{t} = \text{heating rate}$$

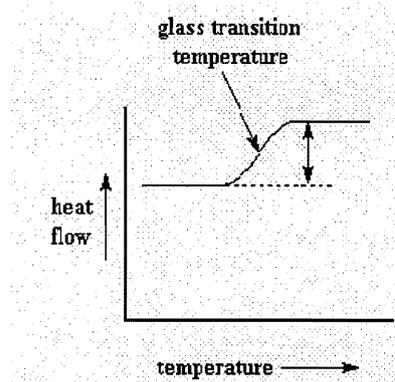
Si se divide el flujo de calor q/t por la velocidad de calentamiento T/t , tendremos calor suministrado dividido por el incremento de temperatura.

$$\frac{\frac{q}{t}}{\frac{\Delta T}{t}} = \frac{q}{\Delta T} = C_p = \text{heat capacity}$$

Cuando agregamos una cierta cantidad de calor a algo, su temperatura se incrementará en una cierta cantidad y que la cantidad de calor necesaria para producir ese determinado incremento se llama *capacidad calorífica*, o C_p . Obtenemos la capacidad calorífica dividiendo el calor suministrado por el incremento resultante de temperaturas se puede deducir la capacidad calorífica a partir del gráfico de DSC.

La Temperatura de Transición Vítrea.

Luego de una cierta temperatura, la curva dará un brusco salto hacia arriba, como éste:



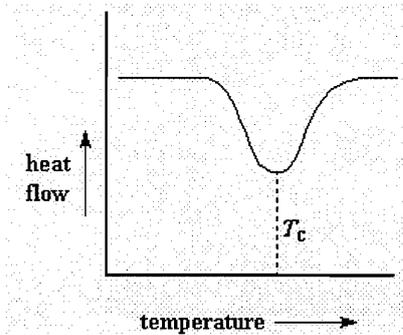
Esto quiere decir que se está teniendo un mayor flujo de calor y también significa que se obtiene un incremento en la capacidad calorífica del polímero. Esto sucede porque el polímero ha sufrido la transición vítrea. Y de acuerdo a la transición vítrea, los polímeros poseen una mayor capacidad calorífica por encima de la temperatura de transición vítrea que por debajo. Debido a este cambio de capacidad calorífica que ocurre en la transición vítrea, podemos emplear la DSC para medir la temperatura de transición vítrea de un polímero. Se puede apreciar que el cambio no ocurre repentinamente, sino que tiene lugar a través de un rango de temperaturas. Esto hace que resulte un poco complicado escoger una T_g discreta, pero generalmente tomamos como T_g el punto medio de la región inclinada.

Cristalización

Por encima de la transición vítrea, los polímeros poseen una gran movilidad. Se contornean, se retuercen y nunca permanecen en una misma posición durante mucho tiempo. Cuando alcanzan la temperatura adecuada, han ganado la suficiente energía como para adoptar una disposición sumamente ordenada (cristales).

Cuando los polímeros se disponen en esos ordenamientos cristalinos, liberan calor. Y cuando este calor se pierde, el pequeño calefactor controlado por computadora que está bajo el platillo de la muestra no se tiene que suministrar más calor para hacer

que la temperatura del platillo aumente. Esta caída en el flujo de calor puede verse como una gran depresión en la curva de flujo de calor versus temperatura:



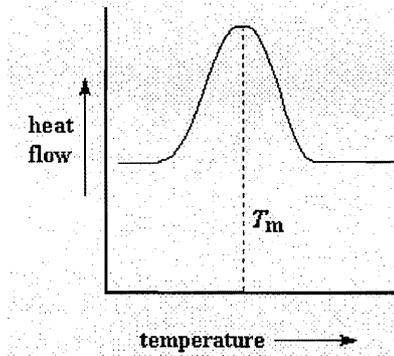
La temperatura en el punto más bajo de la misma, se considera generalmente como la temperatura de cristalización del polímero, o T_c . También podemos medir el área de la depresión, lo cual nos dará la energía latente de cristalización del polímero. Pero, lo que es más importante aún, esta depresión dice que el polímero de hecho es capaz de cristalizar. Si analizáramos un polímero 100% amorfo, como el poliestireno atáctico, no obtendríamos ninguna depresión, ya que estos materiales no cristalizan. Además, dado que el polímero entrega calor cuando cristaliza, se dice que la cristalización es una transición *exotérmica*.

Fusión

El calor puede permitir que se formen cristales en un polímero, pero si se suministra demasiado, puede causar su destrucción. Si se sigue calentando el polímero más allá de su T_c , se llega a otra transición térmica que se denomina fusión. Cuando se alcanza la temperatura de fusión del polímero, o T_m , los cristales poliméricos comenzarán a separarse, es decir, se funden. Las cadenas abandonan sus arreglos ordenados y comienzan a moverse libremente.

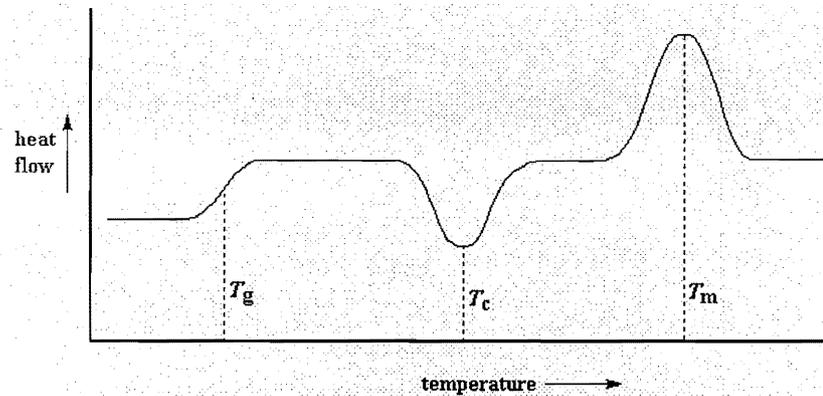
Existe un calor latente de fusión, como así también un calor latente de cristalización. Cuando los cristales poliméricos funden, deben absorber calor para poder hacerlo. La fusión es una transición de primer orden; esto quiere decir que cuando se alcanza la temperatura de fusión, la temperatura del polímero no se incrementará hasta que hayan fundido todos los cristales. O sea que el pequeño calefactor que está debajo del platillo de la muestra, deberá suministrar una gran cantidad de calor al polímero para fundir los cristales y para que la temperatura siga aumentando a la misma

velocidad que lo hace la del platillo de referencia. Este calor extra durante la fusión aparece como un gran pico en nuestra curva de DSC, similar a éste:



Se puede medir el calor latente de fusión midiendo el área de este pico se considera que la temperatura en la parte superior del pico es la temperatura de fusión del polímero, T_m . Puesto que se suministra energía para que el polímero funda, decimos que la fusión es una transición *endotérmica*.

Haciendo una curva completa, veremos algo así:



De hecho, no todo lo que está aquí estará presente en cada gráfico de DSC. La depresión que forma la cristalización y el pico de fusión sólo aparecerá en los polímeros capaces de formar cristales. Los polímeros completamente amorfos, no exhibirán ni cristalización ni fusión. Pero los polímeros que contengan dominios tanto cristalinos como amorfos, mostrarán todas las características que vemos arriba.

Al observar atentamente la curva de DSC, podrá apreciar una gran diferencia entre la transición vítrea y las otras dos transiciones térmicas, cristalización y fusión. En el caso de la transición vítrea, no hay ninguna depresión, como así tampoco ningún pico. Esto

es porque durante la transición vítrea, no hay calor latente entregado o absorbido; pero la fusión y la cristalización sí involucran entrega o absorción de calor. Lo único que se observa es la temperatura de transición vítrea como un cambio en la capacidad calorífica del polímero.

Puesto que hay un cambio de capacidad calorífica, pero no hay calor latente involucrado en la transición vítrea, ésta es una *transición de segundo orden*. Las transiciones como la fusión y la cristalización, que sí tienen calores latentes, son denominadas *transiciones de primer orden*.

La DSC también puede informar qué proporción del polímero es cristalina y qué proporción es amorfa muchos polímeros contienen material tanto amorfo como cristalino con la ayuda de DSC puede decirnos. Si conocemos el calor latente de fusión, ΔH_m , podemos deducir la respuesta.

Se mide el área de ese gran pico que indica la fusión del polímero. Ahora el gráfico es una representación del flujo calórico por gramo de material versus temperatura. El flujo calórico es calor suministrado por segundo, de modo que el área del pico está dada en unidades de calor x temperatura x tiempo⁻¹ x masa⁻¹. Generalmente se considera en unidades de joules x kelvins x (segundos)⁻¹ x (gramos)⁻¹:

$$\text{area} = \frac{\text{heat} \times \text{temperature}}{\text{time} \times \text{mass}} = \frac{\text{JK}}{\text{s g}}$$

Por lo general dividimos el área por la velocidad de calentamiento en nuestro experimento de DSC. La velocidad de calentamiento está dada en unidades de K/s. Por lo tanto la expresión se hace más simple:

$$\frac{\text{area}}{\text{heating rate}} = \frac{\frac{\text{JK}}{\text{s g}}}{\frac{\text{K}}{\text{s}}} = \frac{\text{J}}{\text{g}}$$

Ahora tenemos un número de joules por gramo. Pero dado que conocemos la masa de la muestra, podemos hacerla más simple. Se multiplicamos esto por la masa de la muestra:

$$\left(\frac{\text{J}}{\text{g}}\right) \times \text{g} = \text{J}$$

Se calcula el calor total suministrado cuando el polímero se funde. Ahora al realizar el mismo cálculo para la depresión obtenida en nuestra curva de DSC para la cristalización del polímero, podremos obtener el calor total absorbido durante la cristalización. Llamaremos H_m , total al calor total entregado durante la fusión, y llamaremos H_c , total al calor de la cristalización.

Ahora restaremos uno de otro:

$$H_{m, \text{ total}} - H_{c, \text{ total}} = H'$$

H' es el calor liberado por esa porción de la muestra polimérica que ya estaba en estado cristalino *antes* de calentar el polímero por encima de su T_c . Para conocer cuánto del polímero ya era cristalino antes de forzarlo a hacerse cristalino. Por eso restamos el calor liberado durante la cristalización.

Con H' se puede deducir el porcentaje de cristalinidad. Se divide por el calor específico de fusión H_c^* .

Calor específico de fusión: es la cantidad de calor liberada por una cierta cantidad de polímero, está dado en joules y el calor específico de fusión está dado por lo general en joules por gramo, así que el resultado se obtiene en gramos, el cual se llama m_c .

$$\frac{H'}{H_c^*} = m_c \quad \frac{J}{\frac{J}{g}} = g$$

Esta es la cantidad total del polímero expresada en gramos, que era cristalina por debajo de T_c . Si ahora dividimos este número por el peso de la muestra, m_{total} , obtendremos la fracción de muestra que era cristalina y obviamente, el porcentaje de cristalinidad.

$$\frac{m_c}{m_{\text{total}}} = \text{crystalline fraction}$$

$$\text{crystalline fraction} \times 100 = \% \text{ crystallinity}$$

Así se puede conocer el porcentaje de cristalinidad.

(<http://www.pslc.ws/spanish/dsc.htm>)

8.3.- Anexo C Espectro Electromagnético.

Se denomina espectro electromagnético a la descomposición de la luz en sus diferentes bandas ondulatorias que la componen (ondas de radio, las infrarrojas, la luz visible, la luz ultravioleta, los rayos X y los rayos gamas) todas estas son formas de energía similares, pero se diferencian en la frecuencia y la longitud de su onda. Apenas una pequeña parte del mismo se hace visible, es la franja de onda que imprime nuestra retina y el cerebro interpreta como colores (rojo, anaranjado, amarillo, verde, azul, añil, y violeta), el arco iris es la mejor representación natural de éste efecto, sus colores se alinean al pasar la luz solar por los cristales del agua de lluvia.

Los estudios realizados hacia el siglo XIX, sobre el espectro de luz, habían demostrado que cada elemento del universo emite un espectro característico que lo distingue de los demás. Este conocimiento abrió una nueva ciencia, la ESPECTROSCOPIA.

Cuando un haz de radiación electromagnética alcanza un compuesto orgánico, éste absorbe energía de ciertas longitudes de onda y se determina cuales se absorben o transmiten y se establece el espectro del compuesto.

Prácticamente lo que se sabe de la estructura de la materia es por la interacción de la radiación, para la investigación de los compuestos orgánicos existen básicamente 4 formas de espectroscopia (Resonancia magnética nuclear, vibracional, electrónica, y de masas donde cada una provee de datos específicos sobre la estructura de la molécula. Las mas utilizadse mencionan a continuación (Ball, 2004; Lambert et al, 1998; Mc Murry, 2001; Morrison y Boy, 1990).

a) Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (NMR).

Provee información a cerca de tipos, números y enlaces de los átomos.

El análisis de la estructura puede ser parcial o completa con la ayuda de las interacciones entre MNR y el núcleo activo, medido como la unión y relación del tiempo que provee información acerca de los enlaces de los átomos, además se utiliza para seguir el curso de algunos tipos de reacciones.

Las bobinas exploradoras del equipo varían el campo magnético en pequeñas cantidades. Mientras que las ondas de radio bombardean la muestra cualquier

absorción es detectada; las muestras son giradas para provocar homogeneidad en la misma.

b) Espectroscopia vibracional.

El espectro infrarrojo (NIR) y Raman resulta de las vibraciones que ocurren naturalmente con las moléculas y el haz luminoso provocando un alargamiento o contracción de los enlaces de las moléculas. El espectro provee información acerca de la simetría y la identificación de grupos funcionales de acuerdo al rango del espectro utilizado. Su alta sensibilidad y facilidad de manejo han propiciado extender su uso.

c) Espectroscopia Electrónica.

Se expone una muestra a microondas de longitud de onda conocida el electrón del radical libre gira y genera un momento magnético que varía lentamente puede alinearse a favor o en contra del campo magnético externo. Cuando se establece la condición de resonancia las microondas quedan absorbidas y se presenta la transición del estado basal al estado excitado. Detecta la presencia de radicales libres y mide su concentración y la distribución del lector impar sobre la molécula.

La información acerca de la transición electrónica puede ser obtenida directamente del espectro correspondiente a la zona Ultravioleta y visible por el procedimiento de dicroísmo circular que es sensible en las moléculas quirales. Estas técnicas son usadas cualitativamente para identificar los grupos funcionales, de acuerdo a la posición e intensidad de la banda, además de que se puede determinar la concentración del soluto, siguiendo a la cinética de reacción y constantes de equilibrio.

d) Espectroscopia de Masa

Se utiliza para comprobar la identificación de dos compuestos y para ayudar a establecer estructuras nuevas.

Se bombardean las moléculas con un haz de electrones energizados, que ionizan y fragmentan las moléculas, cada tipo de ión tiene una razón masa a carga (conocido como valor m/e); cada conjunto de iones se analiza de modo que se obtiene una señal y refleja la abundancia relativa del ión que produce la señal.

8.4.- Anexo D Espectroscopia Infrarroja.

La región infrarroja del espectro electromagnético va del intervalo de 7.8×10^7 hasta 10^{-4} , pero en química orgánica sólo se usa la región media de 2.5×10^6 hasta 2.5×10^5 m.

La espectroscopia infrarroja, o IR, es un tipo de espectroscopía vibracional donde se analizan las vibraciones moleculares la mayor parte de los grupos funcionales tienen bandas características de absorción infrarroja que no cambian de un compuesto a otro. Para comprender, se deberá entender los principios del movimiento armónico simple: dos esferas, o masas, conectadas por medio de un resorte (oscilador armónico simple). Una vez puestas en movimiento, las esferas comenzarán a oscilar, o vibrar de aquí para allá a lo largo del resorte, a una cierta frecuencia que dependerá de las masas de las esferas y de la rigidez del resorte. Una esfera de masa pequeña se moverá con mayor facilidad que otra de masa mayor. Por lo tanto, las masas más pequeñas oscilan a mayor frecuencia que las masas más grandes. Un resorte sumamente rígido, es difícilmente deformable y rápidamente retorna a su forma original cuando se deja de aplicar la fuerza deformante. Por otro lado, un resorte débil se deforma fácilmente y demora mucho tiempo en volver a su forma original, de ahí que un resorte más rígido oscilará a mayor frecuencia que uno débil. El enlace químico entre dos átomos puede ser considerado como un oscilador armónico simple. El enlace sería el resorte y los dos átomos o grupos de átomos conectados por el enlace, serían las masas. Cada átomo tiene una masa diferente y los enlaces simples, dobles o triples poseen distinta rigidez, por lo que cada combinación de átomos y enlaces posee su propia frecuencia armónica característica. Cuando un objeto vibra a una cierta frecuencia y encuentra otra vibración de exactamente la misma frecuencia, el oscilador absorberá esa energía.



Figura 33 Enlace entre dos esferas.

A cualquier temperatura por encima del cero absoluto, todos los pequeños osciladores armónicos simples que constituyen una molécula se encuentran en vigorosa vibración. Da la casualidad de que la luz infrarroja está en el mismo rango de

frecuencia que la molécula en vibración. De modo que si irradiamos una molécula en vibración con luz infrarroja, absorberá aquellas frecuencias de la luz que sean exactamente iguales a las frecuencias de los distintos osciladores armónicos que constituyen dicha molécula. Cuando la luz es absorbida, los pequeños osciladores de la molécula seguirán vibrando a la misma frecuencia, pero dado que han absorbido la energía de la luz, tendrán una amplitud de vibración más grande. Esto significa que los "resortes" se estirarán más que antes de absorber la luz. La luz que no fue absorbida por ninguno de los osciladores de la molécula, es transmitida desde la muestra a un detector y una computadora la analizará y determinará las frecuencias que fueron absorbidas.

Antes, sólo era posible obtener buena información irradiando la molécula con una sola frecuencia de luz IR por vez. Esto llevaba mucho tiempo porque existe una gran cantidad de frecuencias y debían realizarse muchos barridos para obtener un buen espectro. Pero ahora, gracias al Algoritmo de la Transformada de Fourier, (Figura 34) puede irradiarse una molécula con cada frecuencia de luz IR a la vez y así obtener un espectro perfecto en sólo cuestión de minutos.

$$F(\nu) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t) e^{-i(2\pi)\nu t} dt \quad \text{and} \quad f(t) = \int_{-\infty}^{\infty} 2\pi F(\nu) e^{i(2\pi)\nu t} d\nu$$

Figura 34 Transformada de Fourier.

La espectroscopía IR es una técnica analítica sumamente simple sin olvidar ocupar el apropiado atuendo de seguridad. Primero, se necesita disponer del material a analizar de algún modo tal que pueda ser introducido en el espectrómetro infrarrojo. Esto se logra generalmente extendiendo un film sobre un disco de cloruro de sodio (sal de mesa) o pulverizando el material con bromuro de potasio, KBr, y haciendo luego una pastilla compacta. Se emplean estas sales porque son invisibles a la luz IR. Existen otras maneras de preparar la muestra así como el no colocar sales; pero estas son las más comunes cuando se trata de polímeros. A continuación, se coloca la muestra dentro del espectrofotómetro, se cierra la tapa, se esperan unos segundos para que en la cámara de la muestra se purgue el dióxido de carbono, se presiona la tecla "SCAN" en la computadora y ya está, en menos de un minuto, se tiene un espectro IR (Mc Murry, 2001; Gregory, 2004).

Interpretación del Espectro.

La interpretación del espectro infrarrojo es difícil debido a que las moléculas orgánicas son tan grandes que tienen decenas de movimientos de estiramiento y flexión de enlace, sin embargo no se necesita interpretar un espectro completo para obtener información sobre su estructura debido a que la mayor parte de los grupos funcionales tienen bandas características de absorción infrarroja que no cambian de un compuesto a otro. Algunas adsorciones específicas de infrarrojo se utilizan para dividir el espectro que va de 4000 a 400 cm^{-1} y se describen a continuación.

Tabla 20 Rango de espectros y tipos de enlaces que identifica.

Rango del espectro	Tipos de enlaces.
4000 a 2500 cm^{-1}	Corresponde a las absorciones causadas por los movimientos de estiramiento de los enlaces sencillos de N-H, O-H (3300 a 3600 cm^{-1}) y C-H (cerca de 3000 cm^{-1})
2500 a 2000 cm^{-1}	Estiramiento de triples enlaces como nitrilos y alquinos.
2000 a 1500 cm^{-1}	Absorben los dobles enlaces de todo tipo. Por lo general los grupos carbonilo absorben de 1670 a 1780 cm^{-1} y alquenos 1640 a 1680 cm^{-1})
Abajo de 1500 cm^{-1}	Es la parte dactiloscópica del espectro infrarrojo. Se presentan un a gran cantidad de absorciones. Debido a la gran diversidad de vibraciones de los enlaces sencillos (C-C, C-O, C-N y C-X). Los enlaces cortos y fuertes vibran con mayor frecuencia y energía. Que los largos y débiles; así como los enlaces que unen átomos pequeños vibran con más rapidez que los que unen átomos grandes.

Fuente: Mc Murry, 2001; Gregory, 2004

8.5.- Anexo E Difracción de Rayos x.

Los rayos X son ondas electromagnéticas con longitudes de onda en el rango de alrededor de 0.1 a 100×10^{-10} m. Se producen cuando electrones que se mueven rápidamente golpean un blanco sólido y su energía cinética se transforma en radiación. La longitud de onda de la radiación emitida depende de la energía de los electrones. Consiste básicamente en un proceso de interferencias constructivas de ondas de rayos X que se produce en determinadas direcciones de espacio. Significa que las ondas tienen que estar en fase, lo que ocurre cuando su diferencia de trayectoria es cero o un múltiplo entero de longitudes de onda.

Laing (2000) menciona diversos métodos para el análisis de Rayos X:

- ✓ El método de Laue
- ✓ El método de polvos
- ✓ Métodos de movimiento del cristal y movimiento de la película
- ✓ El método de rotación
- ✓ El método de Weissenberg
- ✓ El método de presesión
- ✓ El explorador de red recíproca
- ✓ Difractómetros

Método de polvo cristalino.

La difracción de rayos X en muestras de polvo cristalino o muestras policristalinas se puso de manifiesto primeramente en Alemania por P.Debye y P.Scherrer en (1916) y casi al mismo tiempo se desarrolló a través de los estudios de Hull en los Estados Unidos. El descubrimiento del fenómeno de la difracción en este tipo de muestras se convierte rápidamente en una técnica experimental de extendido uso, debido básicamente al amplio campo de aplicación que podemos encontrar para el estudio de sustancias cristalinas. Hoy día esta técnica constituye una habitual herramienta de trabajo con una extraordinaria utilidad en muy distintas disciplinas científicas y tecnológicas, por el carácter polifacético en lo que se refiere a la gran variedad de información que proporciona.

La radiación monocromática de una longitud de onda fija y se coloca el cristal enfrente del haz. Si un plano se coloca exactamente en el valor correcto de θ para reflejar, entonces observaremos uno y sólo un haz reflejado desde aquel cristal. Ahora, aún sosteniendo el cristal fijo a un ángulo θ , que rotamos el cristal alrededor de la dirección del haz incidente de rayos X de tal forma que el plano que causa la reflexión está aún colocado en el ángulo θ en relación al haz de rayos X. El haz reflejado describirá un cono con el cristal en el ápice del cono. Ahora si se tiene un ciento de cristales cada uno de ellos colocado de tal forma que un plano está exactamente en el ángulo de reflexión correcto, con respecto al haz incidente. Se tiene un ciento de haces incidentes cada uno dándonos un punto observable. Si un grupo de un ciento de cristales es rotado alrededor del eje incidente de rayos X. Tendremos ahora un ciento de conos trazados por estos haces reflejados. Si la muestra pulverulenta se coloca dentro del haz de rayos X, habrá muchos cristales en ese polvo que estarán en posición de reflejar el haz incidente y habrá un número suficiente de ellos para conseguir una serie continua de reflexiones puntuales las cuales caerán a lo largo del arco del cono. Esta es la base del así llamado método de polvos o de Debye-Scherrer que es probablemente la técnica más comúnmente utilizada en cristalografía de rayos X.

La identificación de fases cristalinas constituye uno de los campos de aplicación más importantes del método de polvo cristalino. El registro del espectro difractado puede realizarse empleando dos dispositivos experimentales con características bien diferenciadas:

- ✓ Métodos fotográficos (cámaras Debye-Scherrer).
- ✓ Difractómetro de polvo.

La diferencia radica en el registro, en las cámaras de polvo el espectro se registra en una película fotográfica, en la que la densidad de ennegrecimiento indica la intensidad de las radiaciones reflejadas. En el difractómetro de polvo, se obtiene un registro gráfico de las señales que las reflexiones originan en detectores electrónicos de radiación.

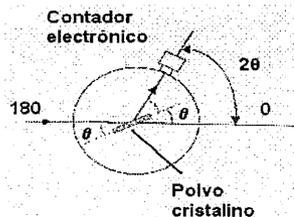


Figura 35 Difractómetro de polvo.

Identificación de fases, método de polvo cristalino.

La identificación de una fase cristalina por este método se basa en el hecho de que cada sustancia en estado cristalino tiene un diagrama de rayos X que le es característico. Estos diagramas están coleccionados en fichas, libros y bases de datos del Joint Committee on Powder Diffraction Standards y agrupados en índices de compuestos orgánicos, inorgánicos y minerales. Se trata, por lo tanto, de encontrar el mejor ajuste del diagrama problema con uno de los coleccionados.

Al analizar diagramas desconocidos, los pasos a seguir son los siguientes:

1. Se ordenan los valores de d en orden decreciente de intensidad.
2. Se busca el grupo Hanawalt adecuado en el manual de búsqueda con el valor de d correspondiente a la línea más intensa.
3. Se comprueba que la d de la segunda línea más intensa se ajuste con el valor de d de la segunda columna del grupo Hanawalt correspondiente del manual de búsqueda.
4. Se toma el valor de d de la tercera línea más intensa del diagrama desconocido y se comprueba si se ajusta con el valor de d la tercera columna Hanawalt del manual de búsqueda.

Si se ajustan los valores de d del diagrama desconocido con los del grupo de Hanawalt del manual de búsqueda se toma la ficha correspondiente y se acaba de comprobar el ajuste de todos los valores de d del diagrama desconocido con los de la ficha. Si las líneas seleccionadas no dan juntas buen ajuste, se eligen otras combinaciones de líneas el diagrama desconocido. En el caso de que el diagrama desconocido corresponda a una mezcla de sustancias se sustrae el diagrama encontrado del experimental y se repite de nuevo el proceso (pasos 1 a 6) hasta que todas las líneas significantes del diagrama experimental se

ajusten a algún diagrama de las fichas. A la hora de repetir el proceso hay que tener en cuenta que un mismo pico de difracción puede corresponder a más de una sustancia y uno se da cuenta observando las intensidades del pico del diagrama experimental y de la ficha, pues cuando el experimental muestra una intensidad muy superior al de la ficha hay que sospechar que corresponde a más de una sustancia. Actualmente existen programas informáticos que nos permiten realizar este proceso de manera automática; se cuenta además con las bases de datos JCPDS, lo cual facilita enormemente la identificación de fases cristalinas por el método de polvo (Castellan, 1998).