

20
2ef.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

ANALISIS DE LOS RESIDUOS GENERADOS EN EL
CURTIDO DE LA PIEL DE POLLO Y CAZON EN EL
PROCESO XIPE.

TESIS MANCOMUNADA
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A N :
LOPEZ ORTEGA ANDREA CECILIA
PLATA JIMENEZ MARIA TERESA



MEXICO, D. F.

1998.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

268497



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.

JURADO ASIGNADO

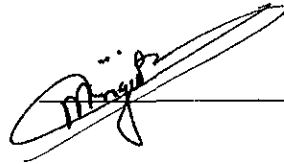
PRESIDENTE: Francisca A. Iturbe Chiñas.
VOCAL: Ma. de los Angeles Valdivia L.
SECRETARIO: Ruth Villaseñor Gutiérrez
1er. SUPLENTE Carlos A. Torres Avila:
2do. SUPLENTE Hermilo Leal Lara

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA

Laboratorio 323, Departamento de Alimentos y Biotecnología Edificio E, Facultad de Química, UNAM.

ASESOR DEL TEMA

M en C. Ma. de los Angeles Valdivia L.



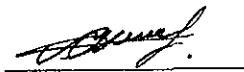
ASESOR TECNICO

Dr. Hermilo Leal Lara

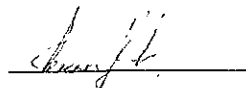


SUSTENTANTES

Andrea C. López Ortega



Ma. Teresa Plata Jiménez



AGRADECIMIENTOS

*A la **UNAM**.*

A la M. en C. Ma. De los Angeles Valdivia y al Dr. Hermilo Leal Lara por su apoyo en la realización de esta tesis.

A la M en C. Fransisca Iturbe por sus consejos y el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis.

A July por su paciencia, consejos y apoyo incondicionales.

A Sandra por toda su confianza.

Al Ing. Fransisco Garza por que gracias a su ayuda se concluyó este trabajo.

DEDICATORIAS

DIOS

Gracias por tu luz en cada segundo de mi vida.

A MIS PADRES

Por todo su apoyo, su aliento y cariño. Los quiero.

BAR, LUIS, PONCHO

Por todo lo que me han ayudado. Los quiero.

ABUE

Eres importante. Te quiero.

PACO

Ese ser bondadoso que me complementa. TQMrP.

TERE, LILI

Son un universo de armonía. Gracias por su confianza.

JULY, SANDRA

Son un ejemplo a seguir. Gracias.

*A todos mis amigos **Gina, Alex, Aarón, Talía, Adela, Carlos, Adriana, Julio** y a toda persona que ha caminado alguna vez a mi lado, a todos ellos y con mucho cariño porque siempre están y estarán presentes.*

*Finalmente a **Isa, Luisa, Gis, Vary, Erika, Andrea C.** por todos los momentos compartidos.*

A todos aquellos seres que siguen presentes aunque se hayan ido.

*Mil gracias...**Andrea** ☀*

DEDICATORIAS

DEDICO ESTA TESIS A LA GENTE QUE QUIERO

A Dios por llevar siempre ese misterio y darme la oportunidad de vivir.

A mis padres que con su cariño y comprensión lograron la realización de este trabajo. Gracias por ser los mejores maestros.

A mis hermanas Sara y Mary, por compartir conmigo la felicidad mas dulce, la paz.

A Manuel, Alma, Lupita, Mariano y Andrea por hacer que el silencio cante y la quietud baile.

A mis tíos, Manuel y Mariano por que siempre me brindaron su ayuda

A Misael por que logra todo lo que se propone. Por que siempre estas y estarás presente.

A July por su apoyo y confianza. Gracias por todo lo que me has brindado.

A Andrea L. y Lili por compartir conmigo la ilusión de un sueño.

A Isa, Sandra, Vary, Luisa, Gis, Andrea C, Erika. por las agradables sobremesas.

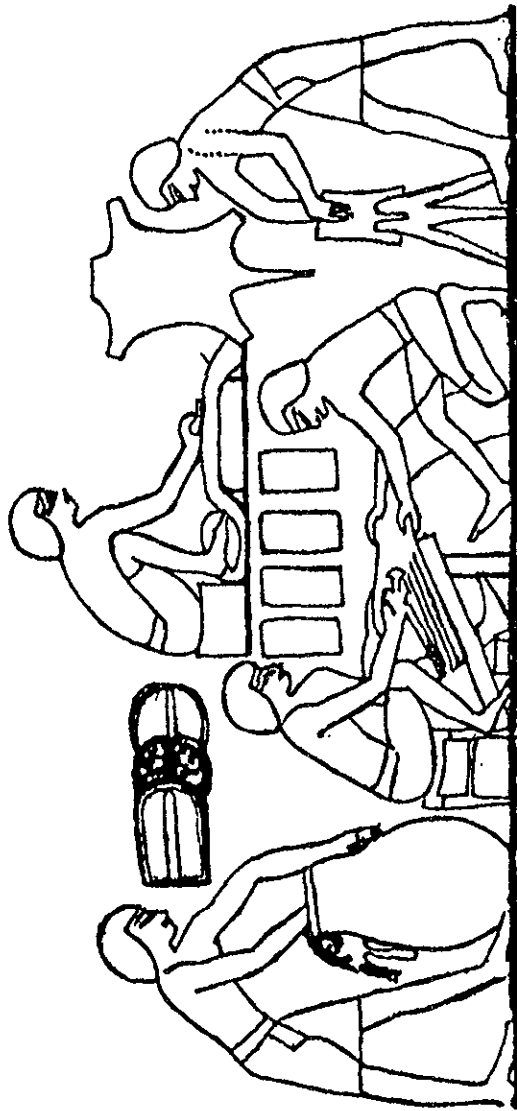
A Tavo, Pina, Hugo, Carlos, Rocio por la amistad que un día existió

A Manuel, Oscar, Wendy, Paola y Claudia por los buenos tiempos que todavía no terminan.

A la memoria de mi tío Jesús y de mis abuelitos, por que aun siguen aquí.

GRACIAS...

Tere 

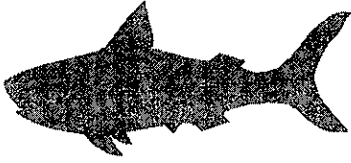


Vestiduras de piel, de la tumba de Rekhmire, Egipto 1450 A. C.

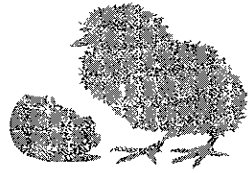
INDICE

INTRODUCCION.	3
OBJETIVOS.	6
CAPITULO I ANTECEDENTES.	8
1.1 Historia del curtido en México.	9
1.2 Proceso de curtido tradicional.	10
1.2.1 Conservación de la piel.	11
1.2.2 Remojo.	12
1.2.3 Depilado.	13
1.2.4 Desencalado	15
1.2.5 Rendido.	16
1.2.6 Picle.	18
1.2.7 Curtido.	21
1.2.8 Neutralización	30
1.2.9 Recurtido.	32
1.2.10 Teñido.	35
1.2.11 Engrase.	38
1.2.12 Secado.	40
1.2.13 Acabado.	42
1.3 Química del proceso Xipe.	44
1.3.1 Generalidades	44
1.3.2 Principales características del proceso Xipe.	47
1 3 3 Remojo (Solución salina).	47
1.3.4 Depilado.	48
1.3.5 Apelmbrado	49
1 3 6 Curtido.	50

1.3.7 Subproductos generados en el proceso Xipe.	51
1.3.8 Canalización de los subproductos del proceso Xipe.	52
1.4 Estructura y Componentes de la piel.	54
1.4.1 Generalidades.	54
1.4.2 Colágeno.	55
1.4.3 Elastina.	62
1.4.4 Proteoglicanos.	67
1.5 Purificación e Identificación de proteínas.	74
1.5.1 Separación de proteínas.	74
1.5.2 Caracterización de proteínas.	77
CAPITULO II MATERIALES Y METODOS.	80
2.1 Primera Etapa.	82
2.1.1 Curtido de las pieles.	82
2.1.2 Análisis fisicoquímico de los residuos	85
2.2 Segunda Etapa.	86
2.2.1 Selección de los residuos.	86
2.2.2 Cromatografía de exclusión molecular.	87
2.3 Tercera Etapa.	92
2.3.1 Análisis de proteínas.	92
CAPITULO III RESULTADOS Y ANALISIS.	94
3.1 Primera Etapa.	95
3.2 Segunda Etapa	106
3.3 Tercera Etapa	114
CONCLUSIONES.	132
BIBLIOGRAFIA.	136
ANEXO.	141



INTRODUCCION



FALTAN PAGINAS

De la: /

A la: 3

INTRODUCCION

El método de curtir pieles es una actividad que se ha realizado durante muchos años atrás y que ha sido transmitida de generación en generación.

Actualmente, el proceso que se usa para curtir pieles es el llamado curtido al cromo, proceso que posee algunos inconvenientes como lo son principalmente el gasto irracional de agua y el uso de sustancias químicas (entre ellas hidróxido de calcio, hidróxido de sodio y sulfuros) que generan residuos tóxicos.

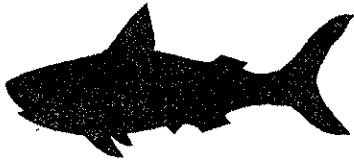
De esta forma, aguas residuales, desperdicios, basura y contaminación son algunos de los “regalos” que actualmente brinda la industria de la curtiduría.

Una de las principales preocupaciones de esta industria, es adquirir la capacidad de disminuir de alguna manera la cantidad de agua consumida y los efluentes generados, además de reutilizar los desechos generados.

Recientemente se ha desarrollado un método de curtido llamado proceso Xipe (Del Cueto, 1991), caracterizado por el consumo mínimo de agua y el uso de sustancias que no generan residuos peligrosos.

La presente investigación permitirá, mediante el curtido de materiales de bajo costo como piel de patas de pollo y piel de cazón, la recuperación de los subproductos generados empleando el método Xipe con lo que se pretende promover este método de curtido que presenta como ventajas sobre el método tradicional entre otras, el menor consumo de agua y la generación de efluentes mayoritariamente no tóxicos.

Así mismo, se pretende la caracterización de los subproductos empleando algunas técnicas, como son cromatografía de exclusión molecular y análisis de aminoácidos, las cuales nos permitirán identificar la posible presencia de algunas proteínas importantes como colágeno y/o elastina, principalmente. De esta manera se crea la posibilidad de su utilización por otras industrias, como podrían ser la cosmetológica, farmacéutica y/o alimentaria, además de contribuir a la conformación de una nueva industria del curtido de pieles de pollo y cazón.



OBJETIVOS



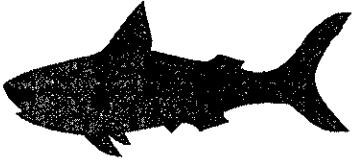
OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- Caracterizar los subproductos generados mediante el proceso de curtido de pieles de cazón y patas de pollo empleando el método Xipe.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer el nivel óptimo de álcali que permita el mayor rendimiento de los componentes proteínicos, sin afectar las características de la piel curtida.
- Caracterizar mediante cromatografía de exclusión molecular los componentes proteínicos presentes en los residuos obtenidos.
- Establece perfiles de aminoácidos de las diferentes fracciones proteínicas obtenidas en la cromatografía de exclusión molecular.



CAPITULO I
ANTECEDENTES



ANTECEDENTES

1.1 HISTORIA DEL CURTIDO EN MÉXICO.

Dentro de las industrias más antiguas se encuentra la industria de la curtiduría, que pretende conservar las pieles, mediante el empleo de ciertas sustancias químicas, con el fin de que estas puedan ser utilizadas y comercializadas.

Antiguamente los hombres mataban animales para alimentarse y aprovechaban sus pieles haciendo cobijas para protegerse del frío.

En México las pieles más usadas eran, obviamente, las propias de los animales de la región, tales como ciervos y pumas. En México, la elaboración del cuero curtido se remonta a épocas anteriores a la conquista; poco a poco los indígenas fueron desarrollando habilidades para curtir las pieles sin conocimiento científico alguno, pero sí como tradición y/o artesanía. Sin embargo, fue hasta el siglo XIX cuando el curtido comenzó a desarrollarse como pequeña industria y pronto empezó el establecimiento de algunos centros curtidores en Michoacán, Jalisco, Guanajuato y Veracruz; sin embargo, este proceso presenta algunas desventajas como son, un elevado consumo de agua y la generación de efluentes tóxicos; estas características lo convierte en un método poco ecológico.

Actualmente la operación del curtido aún se realiza de manera tradicional a pesar de que ya existen algunas propuestas para curtir de una forma más ecológica.

PROCESO DE CURTIDO TRADICIONAL

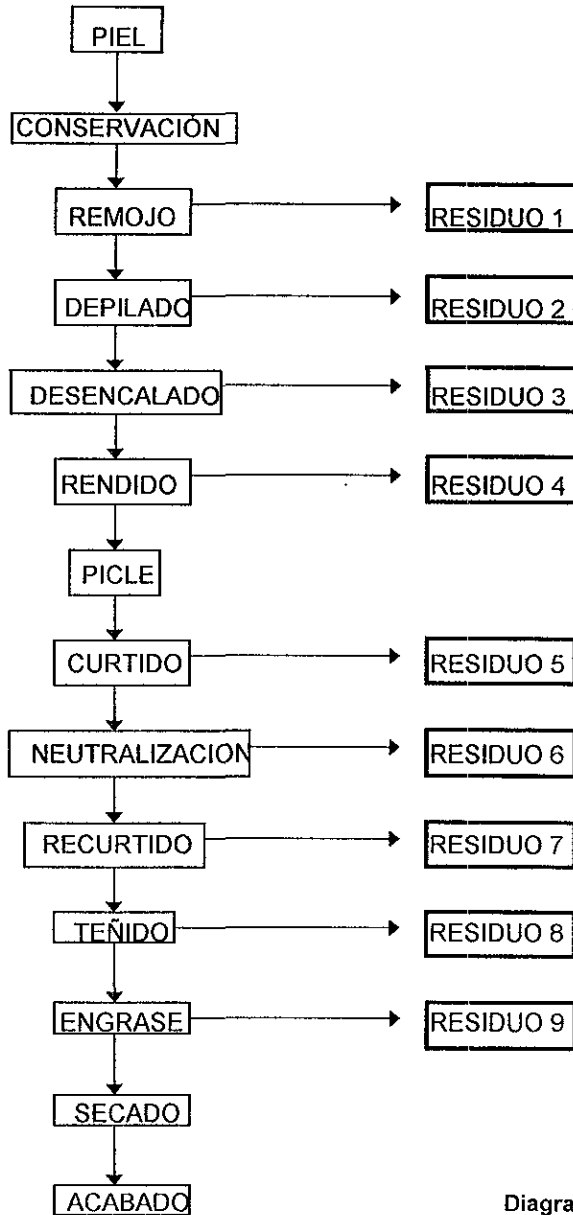


Diagrama 1

1.2 PROCESO DE CURTIDO TRADICIONAL.

1.2.1 Conservación de la piel.

Es ideal que el curtido de la piel se lleve a cabo momentos después de la obtención de la misma, sin embargo las distancias entre las tenerías y los rastros generalmente son grandes por lo cual se aplican métodos de conservación de las pieles.

Su principal fin es controlar el crecimiento de las bacterias proteolíticas que degradan a la piel y extraer la humedad. Actualmente el curado en tanques de salmuera con paletas rotativas es el procedimiento mas común. La salmuera y el salado deshidratan (por ósmosis) alrededor del 45-60 % del contenido acuoso original (Padilla, 1977).

En algunas ocasiones suelen utilizarse algunos conservadores, como: fluoruro sódico, naftaleno con ácido bórico, óxido de zinc y metabisulfito sódico.

Existen algunas propuestas de conservación sin sal para las pieles de vacuno, una de ellas es la mezcla de sulfito/ácido acético y también un procesado con solventes (acetona a pH 4.5-5.0 y alcohol-éter), las cuales requieren procesos más complejos y tienen como finalidad disminuir la carga bacteriana evitando la degradación de la piel (Broitman, 1972).

1.2.2 Remojo.

Se realiza para eliminar materia extraña como estiércol, sangre, barro, etc.; además de solubilizar parcialmente las proteínas globulares y reducir el contenido de sal de la piel, rehidratando las células de la misma para que de esta manera recupere humedad y se reblandezca la piel, con lo cual podrá llevarse a cabo el curtido de una manera satisfactoria.

El proceso de remojo es importante para los procesos posteriores, generalmente se hace en baños cilíndricos en los que a las pieles se les añade agua (4-15 litros / minuto por kilogramo de cuero), además de detergentes y desinfectantes para evitar la proliferación de microorganismos. Las pieles son removidas con una paleta giratoria, esta agitación flexibiliza y ablanda las pieles. También suelen utilizarse pilas, tambores giratorios de eje horizontal o paletos (ruedas con aspas y paletas) (Hansen, Ockerman, 1994).

El tiempo de remojo varía de 18 a 20 horas, dependiendo del tipo de piel que se desee curtir. El aumento de tiempo y temperatura favorecen el efecto del remojo al ayudar a la dispersión de las proteínas globulares. Se recomienda trabajar con temperaturas del agua de 10-20 °C, temperaturas más elevadas pueden aflojar el cuero y engrosar la fibras perjudicando los pasos posteriores del curtido y obteniendo pieles de mala a mediana calidad.

El agua empleada debe de estar libre de materia orgánica y hierro que pudiera manchar los cueros; los cueros remojados inadecuadamente tardarán más en depilarse.

1.2.3. Depilado.

La piel debidamente hidratada, limpia y con parte de sus proteínas eliminadas en el remojo, pasa a la operación de depilado, cuyo objetivo es la eliminación de los pelos, ya sea destruyéndolos o modificando el tejido epidérmico alrededor del bulbo piloso, además tiene como propósito atacar el sistema lipoprotéico que lo rodea y acondicionar la piel para las operaciones posteriores al curtido.

El depilado se realiza comúnmente utilizando métodos químicos, sin embargo en algunos casos se recurre a métodos mecánicos.

En la Tabla 1 se presentan las principales sustancias químicas usadas para este fin.

REACTIVO	EFEECTO	TIEMPO
Ca (OH) ₂ Sol. Saturada	Debilita la base de los folículos	No se menciona.
Na ₂ S o sulfhidrato sódico	Disuelven el pelo.	24 a 48 horas

Broitman B. 1972.
Aguilar R. 1990.

Tabla 1

Al utilizar hidróxido de calcio como agente depilante el proceso recibe el nombre de "encalado"

El hidróxido de calcio, aunado al sulfhidrato sódico, actúan sobre las proteínas del pelo hidrolizándolas, destruyendo su estructura gradualmente y finalmente solubilizandolas como moléculas mas pequeñas.

El encalado no solo actúa sobre las proteínas, sino también sobre algunos lípidos, se lleva a cabo la saponificación parcial de las grasas y se suaviza el cuero modificando las fibras colágenas. (Aguilar, 1990). Este proceso se favorece con la adición de sulfuro de sodio, disminuyendo el tiempo de depilado. Las concentraciones utilizadas varían dependiendo del tipo de cuero que se desea obtener y del uso que se le dé a los residuos sólidos (pelos). Una concentración alta de sulfuro de sodio aumenta la cantidad de pelo solubilizado, haciendo imposible la posterior utilización de estos residuos.

El tiempo de depilado varia de 24-72 horas de acuerdo a la concentración utilizada de hidróxido de calcio y sulfuro de sodio. Utilizando pH elevados (superiores a 11.5) y temperaturas altas, el pelo se puede disolver en unas horas. Si el pelo no se destruye o elimina mediante métodos químicos, entonces será necesario utilizar también un método mecánico (Hansen, Ockerman, 1994).

En el caso del curtido de pieles de pescado se realiza el desescamado, utilizando soluciones de álcalis como carbonato de sodio u

óxido de calcio, conteniendo sulfuro de sodio, durante un periodo de 24-48 horas (Aguilar, 1990).

1.2.4. Desencalado.

En el desencalado los cueros se lavan para eliminar excesos de álcali (cal) y grasas, además de proporcionar a la piel un pH adecuado para la etapa posterior (rendido).

El exceso de cal puede encontrarse en la piel como:

- a) Calcio fijado por la piel.
- b) Calcio sin fijar en forma de solución o suspensión.
- c) Calcio en forma de jabones.

El calcio que se encuentra en solución o como jabones se elimina de manera rápida por acción del agua, mientras que para eliminar el calcio fijado por la piel, es necesario la adición de cloruro de amonio o sulfato de amonio, para formar sales de calcio que son fácilmente solubles.

Durante el desencalado, la temperatura se eleva gradualmente lavando con agua caliente, alrededor de 40-45 °C. Deben evitarse las altas temperaturas pues de lo contrario pueden llegar a dañarse las fibras suaves de la piel.

En algunos casos, como por ejemplo el cuero de cerdo es necesario adicionar sustancias emulsificantes o agentes tensoactivos, como alcoholes

grasos superiores o sales de amonio cuaternario, para facilitar la extracción de grasa y poder continuar con el proceso de curtido (Hansen, Ockerman, 1994).

En esta operación es importante el ajuste del pH. El desencalado debe solubilizar la cal absorbida y colocar al cuero en el pH deseado. El desencalado debe ser gradual y controlando el pH (Aguilar, 1990).

En las operaciones de descalcificación el pH se reduce desde 10-13 hasta aproximadamente 8-9 (Hansen, Ockerman, 1994).

1.2.5. Rendido.

Antiguamente este proceso consistía en tratar la piel con excremento de perro, debido a que las bacterias presentes en el excremento producían ciertas enzimas proteolíticas (Elizalde, 1973). Este proceso también es conocido como apaleado.

En este proceso ocurren varias reacciones de tipo enzimático, dentro de las principales se encuentran la digestión y disolución de algunos componentes proteínicos distintos al colágeno, de esta manera se tiene un colágeno más puro, favoreciendo a las etapas posteriores del proceso de curtido y ayudando a obtener pieles de buena calidad.

La operación de rendido se realiza en un baño tibio a pH 7-9 el cual se logra mediante el desencalado. La presencia de sales de calcio ayuda a

activar a la mayoría de las enzimas del proceso, generalmente estas enzimas son de naturaleza proteolítica, como las que se indican en la tabla 2.

ENZIMA	CARACTERISTICAS
PROTEASAS	.
a)Exopeptidasas	Son activas solo sobre compuestos simples con uno o más grupos terminales polares, como amino y carboxilo
b)Endopeptidasas	Hidrolizan compuestos sin grupos terminales polares libres. Como tripsina y quimotripsina
c)Tripsina	Es capaz de digerir las proteínas desnaturalizadas en medio alcalino. Generalmente se obtiene del páncreas de cerdo.
d)Elastasa	Enzima pancreática que degrada a la elastina.

Tabla 2

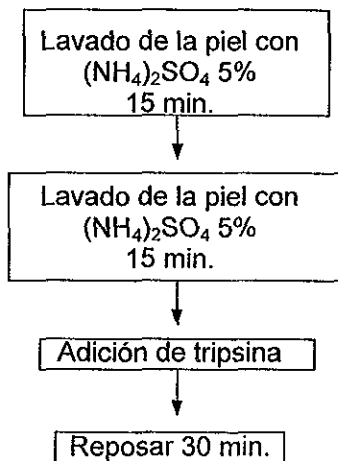
Actualmente las soluciones para el rendido son soluciones de enzimas de origen microbiano, fúngico (con frecuencia salvado) o animal. (Hansen, Ockerman, 1994).

La utilización de las enzimas puede quedar ejemplificada en el diagrama 2. Se cree que el rendido elimina la elastina y algunas otras proteínas degradadas, pero también se cree que el fin del rendido es cambiar el orden estructural de las fibras de colágeno.

Un rendido incompleto provocará dureza, por la inadecuada separación interfibrilar lograda; y por la presencia de productos de degradación proteínica. La rapidez con que se lleve a cabo este proceso depende, al igual que en procesos anteriores, de la temperatura, el pH y por

supuesto la concentración enzimática, pudiendo tardar desde unas horas, hasta 16. Generalmente el desencalado y el rendido se realizan simultáneamente

PROCEDIMIENTO PARA EL USO DE ENZIMAS EN EL RENDIDO



Aguilar R. 1990

Diagrama 2.

1.2.6. Pickle.

El principal objetivo de este paso en el método de curtido, es el de llevar al cuero a un pH ácido, que será el adecuado para el curtido.

Para el curtido al cromo (método de curtido mas popular en la actualidad), es esencial tener las pieles en condiciones ácidas (pH menor a 3), para que de esta manera las sales de cromo insolubles en medio alcalino no precipiten sobre las fibras del cuero. A consecuencia del descenso del pH, el pickle puede funcionar para preservar las pieles y/o para ser procesadas inmediatamente.

Normalmente en el picle se utilizan ácido sulfúrico y cloruro de sodio. El método general de picle consiste en colocar el lote de pieles rendidas en un paleta o tambor, añadir agua para sumergir las pieles y luego adicionar la cantidad adecuada de sal sobre la base de la solución. Esto se somete a agitación, posteriormente se agrega la cantidad requerida de ácido y se continúa el picle durante el tiempo deseado, el cual depende de la tenería en particular. Generalmente el tiempo fluctúa entre 8 y 24 horas para llegar al equilibrio, aunque no siempre se alcanza esta condición y a veces suelen emplearse tan solo 1.5 horas. Mediante esta operación se alcanza un pH de entre 2.5 y 3.8, aunque no se cuenta con cifras exactas ya que depende de muchos factores entre los que se encuentran el equipo disponible, el tipo de piel, los métodos empleados en las operaciones previas al curtido y el criterio del curtidor.

El ácido solo actúa de manera importante por arriba del 3 % en base al peso de la piel depilada, la adición de cloruro de sodio evita un hinchamiento drástico que reduciría la penetración del agente curtiente.

A veces, para el curtido al cromo se prefiere la utilización de ácido fórmico, lo cual aporta un enmascaramiento o amortiguamiento del curtido al cromo; la utilización de este sistema amortiguador disminuye la posibilidad de hinchamiento ácido y puede dar como resultado una piel mas tersa y uniforme.

Las transformaciones químicas que sufre la piel durante el piclado son fundamentalmente el cambio de cargas, de negativa que tenía durante el

apelambrado a positiva. Esto permite unirse a los iones sulfato de la solución curtiembre de cromo, que se agregará en el paso siguiente.

Otra manera de amortiguar las soluciones de ácido en el picle es la adición de acetato de sodio. En la tabla 3 se comparan los 2 métodos con base en el pH a que se llega en las condiciones descritas

REACTIVO	CONCENTRACION	pH	TIEMPO.
HCOOH y NaCl.	5% de HCOOH de 85% de conc. Y 1:10. NaCl al 15%.	2.5 - 2.8	De 8 a 12 horas.
NaCl, $(SO_4)^{=}$ y H_2SO_4 .	1.7% H_2SO_4	2.5-3.5	De 8 a 24 horas.

Aguilar, 1990.
Padilla, 1977.

Tabla 3

Algunas veces se utiliza además del agua, sal y ácido sulfúrico; algunas sustancias como formaldehídos y sulfato de aluminio, entre otras. Estas sustancias son débilmente curtientes, provocando que la piel no sea tan sensible a las sales curtientes de cromo.

Muchos curtidores piensan que un incremento del ácido en su proceso producirá una piel mas firme o apretada; un decremento, más suavidad y aflojamiento (CONACYT, 1975). Sin embargo esto no se ha comprobado, pero se dice que un picle llevado hasta el equilibrio produce buenos resultados, independientemente de las cantidades de ácido.

Si en el picle no se utilizara la sal, el cuero sufriría un hinchamiento drástico y la penetración de la sustancia curtiembre seria mínima. Así, al

incrementar la cantidad de ácido a utilizar, se debe incrementar también la cantidad de sal.

Por otro lado, altos niveles de sal y poco ácido, puede provocar una deshidratación como consecuencia de la acción de la alta concentración de sal.

1.2.7 Curtido.

El término curtir se emplea para describir el procesos de conversión de la piel putrescible en un producto estable: la piel terminada, consiste de colágeno en estado curtido; dentro de las principales características de un curtiente está su capacidad para formar una combinación irreversible con el colágeno, para que éste sea resistente al agua.

Una de las características importantes de una sustancia curtiente es su capacidad de estabilizar al colágeno mejorando su resistencia al calor, a las proteinasas y a los agentes promotores del hinchamiento, evitando así el aglutinamiento de las fibras colaginosas al secarse la piel.

Por lo tanto el curtido al cromo puede considerarse como una estabilización interna de la estructura colaginosas.

El primer proceso eficiente de curtido fue descubierto por Augustus Schulz (1884), patentado como "El proceso de dos baños de cromo", en donde los cueros son tratados con una solución de ácido crómico producido

por la acción de ácido clorhídrico en dicromato de sodio o de potasio y luego con una solución de tiosulfato de sodio y ácido clorhídrico (Broitman, 1972).

Actualmente el método más popular para curtir pieles es el método del curtido al cromo, debido a su rapidez y a que le da al cuero propiedades físicas y químicas deseables, como estabilidad y resistencia térmica entre otras muchas.

Ya que éste es uno de los pasos determinantes en el curtido, es importante conocer un poco más acerca de los procesos que se llevan a cabo.

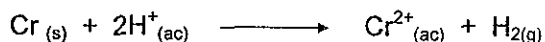
LAS SALES DE CROMO.

El cromo es obtenido principalmente a partir del mineral *cromita*, FeCr_2O_4 , se puede pensar en esta sustancia como un óxido mezclado de fórmula $\text{FeO} \cdot \text{Cr}_2\text{O}_3$ (Brown, Lemay, 1985).

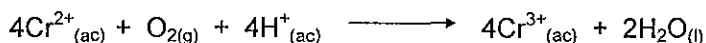
El cromo puede perder dos electrones para formar compuestos cromosos; tres para formar compuestos crómicos y seis para formar cromatos y otras especies oxo. Frecuentemente el cromo se encuentra en disolución acuosa y en el estado de oxidación 6+.

En disolución básica, el ion cromato (amarillento) CrO_4^{2-} es el más estable y en disolución ácida se forma el ion dicromato, $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$.

El cromo se disuelve lentamente en ácido clorhídrico o sulfúrico diluído liberando hidrógeno y formando el ion cromoso (color azul).

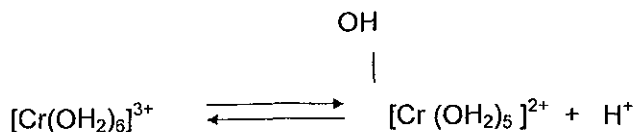


Sin embargo el ion cromo II rápidamente se oxida con el aire para formar el ion cromo III (color violeta) (Brown, Lemay, 1985).



Para el curtido, el estado más interesante es el trivalente, ya que los compuestos crómicos que incluyen las sales básicas de cromo son capaces de formar complejos polinucleares estables, lo cual aporta notables características curtientes además de que el átomo de cromo forma un enlace muy estable con el grupo carboxilo de las proteínas (colágeno principalmente). Sin embargo, a menudo el complejo más estable resulta ser también el más inerte o menos reactivo; por lo que los complejos de cromo trivalente son en general lentos al reaccionar.

El complejo catiónico más simple es el hexacuocromo $[\text{Cr}(\text{OH}_2)_6]^{3+}$ porta tres cargas positivas. La unión de la molécula de agua con el átomo de cromo se realiza por medio del átomo de oxígeno de la molécula OH_2 , el cual contribuye con dos electrones para ser compartidos entre el Cr y el grupo acuo. Entonces, el oxígeno del agua se carga positivamente, esta carga provocará la liberación de un protón.



Esta reacción explica la acidez de muchas soluciones de sales de cromo. La adición de ácidos minerales invierte esta reacción y los álcalis tienden a promoverla.

Para el curtido, las sales de cromo más importantes son los sulfatos básicos; la gran afinidad del grupo sulfato por el cromo trivalente provocará la formación de complejos hidroxisulfato aniónicos y no-iónicos, bajo ciertas condiciones.

De esta manera, la mayor parte de la piel curtida al cromo se produce por medio del "proceso de un baño", en el cual se requiere que la piel piclada se trate directamente con una solución de sulfato básico de cromo.

Existen diversos métodos para preparar los licores curtientes y dentro de ellos el más común y comercial es la reducción del dicromato de sodio ($\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) con un azúcar reductor (como la maltosa) y ácido sulfúrico para que de esta manera ocurra la reducción de las sales a sulfato crómico básico (también llamado "cromo"); esta reacción es exotérmica y sumamente violenta, por lo que se recomienda tener una mezcla de ácido y bicarbonato en solución y agregar lentamente la solución del azúcar.

En la práctica, la oxidación del azúcar a CO_2 y agua no es cuantitativa y se forman otros compuestos orgánicos como formaldehído, ácido acético,

ácido fórmico, ácido oxálico, principalmente. La cantidad necesaria de azúcar depende del poder reductor del mismo (Kg. de dicromato reducido / Kg. del azúcar reductor).

También suele adicionarse una sal neutra, ya sea sulfato de sodio o cloruro de sodio, el fin que se persigue con la adición, es regular el hinchamiento ácido (mencionado anteriormente); el hinchamiento puede provocar una distribución dispareja del cromo en el interior del cuero y puede dificultar el enlazamiento entre los grupos proteínicos.

La presencia de sulfatos neutros, como el sulfato de sodio en altas concentraciones, origina también la formación de complejos no iónicos dominantes.

En las soluciones existen los siguientes tipos de compuestos (Figura 1,2,3) (Padilla, 1977).

a) Complejos catiónicos del tipo general.

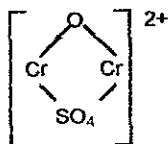


Figura 1

b) Complejos aniónicos como: $[\text{Cr}_2(\text{OH})_2(\text{SO}_4)_3]^{2-}$

Figura 2

c) Complejos no iónicos.

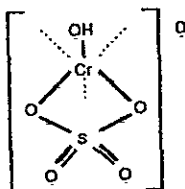


Figura 3

BASICIDAD DEL CROMO.

Basicidad, es el porcentaje total de las valencias primarias de los átomos de cromo presentes que se encuentran ocupadas por grupos OH; por lo tanto, si cada átomo de cromo contiene un grupo hidroxilo, el complejo es de basicidad 33.3%, si contiene dos grupos hidroxilo es de 66.6% básico. El hidróxido de cromo precipitado es de basicidad 100% debido a que sus tres valencias primarias están ocupadas por grupos OH⁻, como se muestra en la tabla 4

COMPUESTO	% DE BASICIDAD.
$\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$	00.00
$\text{Cr}(\text{OH})\text{SO}_4$	33.33
$\text{Cr}_2(\text{OH})_4\text{SO}_4$	66.66
$\text{Cr}(\text{OH})_3$	100.00

Padilla J. 1977.

Tabla 4

Las sales de cromo que se emplean en el curtido suelen tener entre 33 y 45% de basicidad, esto es porque la basicidad puede tomar valores fraccionarios entre 0 y 100, debido, a que no todos los átomos de cromo en

la sal empleada para curtir contienen el mismo número de valencias primarias ocupadas por los grupos OH, es decir que la solución en este aspecto no es homogénea. (Padilla, 1977).

Es necesario destacar que la carga del complejo de cromo no necesariamente tiene una relación directa con la basicidad.

REACCIONES QUE PROVOCA EL CURTIDO.

La mayoría de los investigadores (Padilla, 1977) concuerdan que la reacción inicial del curtido al cromo está denominada por la afinidad de los grupos libres carboxilo de los ácido aspártico y glutámico por la sal de cromo.

La fijación de cromo por la proteína se incrementa con el aumento en ionización del grupo COOH, teniendo que el intervalo de ionización de este grupo va de pH = 2 hasta pH = 4.

La naturaleza del cromo, permite interacciones donde la proteína (colágeno) puede considerarse un ligando coordinado, por tanto los enlaces tienden hacia el tipo de unión covalente.

Sin embargo, aún mas importante es la reacción que se da entre las cadenas adyacentes del colágeno, donde se presenta una reacción de unión transversal y las etapas en esta unión transversal comprenden:

A) Los complejos ya han reaccionado con los grupos carboxilo de las proteínas.

B) Al incrementarse el pH del medio de curtido, el sulfato asociado al cromo va siendo desplazado por el grupo hidroxilo; estos grupos OH son entonces compartidos por átomos de cromo trivalente.

En el proceso de curtido, conforme va aumentando la basicidad, el tamaño del complejo cromo-colágeno crece, permitiendo de esta manera la unión transversal y dando como resultado un curtido completo (figura 4).

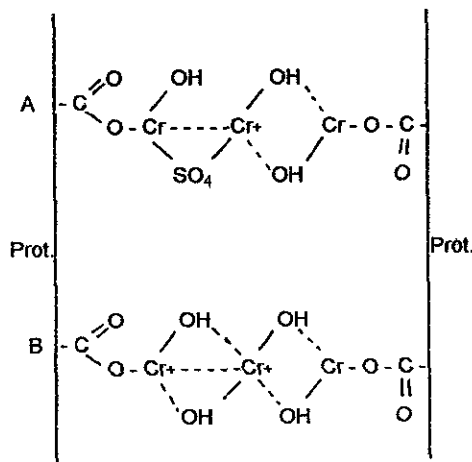


Figura 4

Respecto a la formación del complejo, existe una química muy interesante. Las sales neutras (cloruros y sulfatos), adicionadas al curtido, representan agentes de bajo poder de formación de complejos, estas sustancias son llamadas agentes enmascarantes.

La acción de estos agentes enmascarantes sobre el curtido al cromo, se da al modificar la afinidad del complejo por la proteína, la adición de estos agentes modifica la migración eléctrica del compuesto de cromo y la resistencia de la sal de cromo a ser precipitada por adición de álcali. De esta manera, la adición de un agente enmascarante resultará en la formación de un complejo cromo-anión-enmascarante.

Se ha observado que el ion formiato (HCOO^-) posee las propiedades mas favorables de estabilización de todos los curtientes crómicos y forma un complejo de propiedades curtientes particularmente buenas. Un licor con formiato de sodio como agente enmascarante, presenta una reacción poco dependiente del pH.

La formación de complejos curtientes por la reacción entre la sal básica de cromo y el agente enmascarante no es una reacción rápida. Es preciso señalar que para lograr un verdadero efecto enmascarante, es necesario un calentamiento o añejamiento después de haber adicionado el agente al licor de cromo y antes de utilizar el licor para el curtido.

Algunos curtidores prefieren tener al agente enmascarante en el picle como ácido fórmico y otros añaden formiatos al tambor que contiene el agente crómico curtiente.

Durante el periodo inicial del curtido (6 horas), la queratina y la fibroína prácticamente no han fijado cromo, mientras que el colágeno (cuero) ha combinado más de la mitad del cromo del total que es capaz de ligar, en un curtido de 28 días.

Es importante destacar que después del curtido las pieles toman una coloración azul verdosa y son transferidas a grandes cajones para escurrir el exceso de líquido.

1.2.8 Neutralización.

Después de efectuado el curtido al cromo es necesaria una elevación en el pH de la superficie de la piel; de esta manera es posible prepararla para los procesos a los que será sometida posteriormente: recurtido, teñido, engrasado.

Es muy importante la adecuada selección de la sustancia neutralizante, la piel después del curtido presenta características ácidas, (pH de 3.4-3.7), por lo que se debe adicionar una base adecuada para su neutralización.

Los diferentes agentes neutralizantes poseen diferentes efectos sobre la estructura fibrosa del cuero. Una sobre-neutralización tiende a producir una piel más suave, mientras que una sub-neutralización tiende a generar una piel firme y delgada. Para prevenir una neutralización excesiva o muy drástica los agentes neutralizantes se pueden añadir lentamente y diluidos, pues incluso la acción del agua corriente ejerce un cierto efecto neutralizante. En la tabla 5 se presentan algunas bases utilizadas para la neutralización y sus propiedades. (Padilla,1977).

AGENTE NEUTRALIZANTE.	CARACTERISTICAS.
Sosa cáustica (NaOH).	Por su alta causticidad y su acción astringente no se recomienda.
Carbonato de sodio (Na ₂ CO ₃).	Por su astringencia es poco recomendable, aunque es uno de los más comúnmente utilizados.
Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃).	Es uno de los agentes más comúnmente usados, pero tiende a producir piel de tacto delgado y sin cuerpo.
Bicarbonato de amonio (NH ₄ HCO ₃).	Penetra más profundamente en el cuero, provoca una piel un poco más suave al tacto que el bicarbonato de sodio.
Bórax (Na ₂ BO ₄).	Posee una acción neutralizante más lenta, evitando así una flor torcida o estirada (de la piel), da buena neutralización dejando el cuero con una agradable redondez.
Tiosulfito de sodio (Na ₂ S ₂ O ₃).	Puede usarse dentro de ciertos límites, su acción produce un cuero de consistencia firme.

Tabla 5

El tiempo de neutralización es corto, entre 15 y 30 minutos aproximadamente, aunque este tiempo suele variar de curtidor a curtidor; la temperatura utilizada es de 30-35°C. Es necesario el empleo de lavados para de esta manera llevar la temperatura al punto deseado para el siguiente proceso, así como para eliminar algunas sales que se hayan podido formar.

La mayoría de los curtidores opinan que los álcalis fuertes, tales como el bicarbonato de sodio o el hidróxido de sodio son peligrosos al utilizarlos para neutralizar, por sus efectos sobre la apariencia final del cuero.

Al terminar la neutralización, el pH de los cuero deberá ser de 5.3-5.5 en la superficie y en el interior el pH deberá disminuir progresivamente hasta alcanzar un pH de 4.5 aproximadamente. Esta diferencia de pH en el interior y superficie del cuero es importante para un teñido y engrase adecuados.

1.2.9 Recurtido.

La piel curtida al cromo posee ciertas características como resistencia al calor y elasticidad interna; sin embargo le falta firmeza, lo cual no se presenta en las pieles que han sido curtidas por métodos vegetales, es por eso que al recurtir el cuero con extractos vegetales, mejora la flexibilidad de la piel, y el incremento en el poder de retención de grasa da solidez, consistencia y uniformidad.

Las sustancias que se utilizan para recurtir son los taninos vegetales; el curtido vegetal se realiza en una serie de baños, primero agitados y después estáticos, los cuales contienen concentraciones cada vez mayores de líquido curtiende. Los extractos vegetales (taninos) son las sustancias más antiguas empleadas por el hombre para realizar el curtido de pieles, estas sustancias son extraídas de algunos árboles y arbustos y pueden ser encontrados en las maderas, cortezas, nueces y hojas principalmente (Hansen, Ockerman, 1994).

En la tabla 6 se mencionan algunas de las sustancias curtientes más comúnmente utilizadas:

NOMBRE DEL TANINO	PAIS DE ORIGEN	EXTRAIDO DE	% DE CURTIENTE.
Castaño	Yugoslavia.	Madera.	6 - 15
Valonia	Turquía.	Frutos.	16 - 38
Mirabolanos	India.	Frutos.	25 - 48
Divi-Divi.	Centroamérica.	Frutos.	25 - 50
Encina	Europa Central	Madera.	3 - 10

Ríos A. 1975.

Tabla 6

Los taninos son compuestos polifenólicos que se dividen en de dos tipos de acuerdo con su comportamiento en soluciones ácidas:

- 1) Taninos hidrolizables derivados del pirogalol. (Se dispersarán cuando son ebullicos en solución ácida).
- 2) Taninos condensados, derivados del catecol. (Aumentan su peso molecular cuando son ebullicos en solución ácida).

En la tabla 7 se presentan ejemplos de estos taninos.

TANINOS HIDROLIZABLES	TANINOS CONDENSADOS
Almendra de la India	Cicuta.
Leño de castaño	Acacia australiana.
Valonia.	Quebracho.
Divi-Divi	Mimosa.
Corteza de roble.	Gambier.
Acido tánico.	Corteza de abeto rojo
Zumaque.	Mangle.

Hansen, Ockerman, 1994.

Tabla 7

Se dice que los curtientes vegetales se disocian en glucosa y ácido gálico durante el proceso de curtido, sin embargo, el mecanismo del curtido vegetal no ha sido plenamente establecido, por la complejidad de los sistemas y de los fenómenos que este involucra. Generalmente se acepta que el curtido por medio de taninos probablemente se deba a la unión de los enlaces de hidrógeno de los grupos fenólico y los enlaces peptídicos de las cadenas proteicas, pero se cree que este proceso no es estrictamente químico, sino que también interviene la adsorción física. En algunos casos suele incorporarse a la piel el 50% del peso de los taninos.

Actualmente no solo se emplean taninos vegetales, sino que pueden emplearse compuestos sintéticos como las llamadas "syntans", que son compuestos químicos sintéticos obtenidos a partir de la condensación de ácidos sulfónicos o fenoles con formaldehído, pero también pueden ser del tipo de resinas acrílicas.

Estas sustancias son empleadas para la elaboración de cueros suaves y para darle al cuero tonos blancos o pastel, debido a que presentan un efecto decolorante sobre las pieles color verde-azulado curtidas al cromo.

Normalmente el curtido vegetal se lleva a cabo en el rango de pH 4 a 6, entonces si el cuero al cromo ha de recurrirse al vegetal, la neutralización puede ser posterior al recurtido. El agente curtiente debe permanecer en contacto con la piel por 1 a 2 horas (Padilla, 1977).

1.2.10 Teñido.

El principal objetivo de este procedimiento es mejorar la apariencia de los cueros obtenidos, mediante el teñido pueden obtenerse cueros coloreados. No solo se trata de conseguir el tono correcto e intensidad del color, sino que también debe tenerse en cuenta que los colores sean resistentes a la pérdida de intensidad, que no se despinten y sean fáciles de limpiar en seco o lavables.

La mayoría de las pieles no tienen una pigmentación ni un granulado uniformes, aunque se busca que el producto después del curtido lo sea, la mayoría de las veces no es así.

Ya se mencionó del color que presentan las pieles después del curtido (azul-verdoso), cabe destacar que el color es pálido y puede ser fácilmente decolorado.

Existen un sin número de colorantes que se utilizan para el teñido, estos colorantes pueden ser clasificados en :

- a) Aniónicos. Que son sales alcalinas de colorantes ácidos.
- b) Catiónicos o básicos. Sales ácidas de colorantes básicos.

Los catiónicos poseen escasa afinidad por los cueros al cromo por lo que requieren de una sustancia mordente para su acción. Los más utilizados son los aniónicos; estos colorantes se combinan con las pieles curtidas al cromo por medio de fuerzas de valencia primarias y secundarias.

A continuación se muestra una clasificación de los colorantes aniónicos.

- **ACIDOS.**

Derivan su afinidad de sus grupos ácidos dentro de la molécula, incluyen colorantes penetrantes y de superficie. Pueden ser utilizados en todo tipo de pieles; algunos poseen efectos suavizantes sobre la piel al cromo.

- **METALICOS.**

Normalmente son ácidos con un elemento metálico (por lo general cromo) unido por coordinación a la molécula de colorante. Son de baja astringencia y suelen emplearse para sombreados tipo pastel.

- **MORDENTES.**

Poseen grupos capaces de coordinar con el cromo, el cual puede ligarse a la unión azo ($N=N$) o a un grupo terminal salicilato. El cromo proviene del dicromato de sodio y algún agente reductor como la glucosa.

- **DIRECTOS.**

Se aplican sobre las fibras de algodón sin necesidad de un mordente. Tíñen más a nivel superficial que los colorantes ácidos. Pueden ser astringentes y producir aspereza al tacto en la superficie de la piel. Poseen poca afinidad por los cueros curtidos al vegetal.

- **DESARROLLADOS.**

Poseen grupos capaces de diazotizarse. Producen un color muy negro y muy firme.

El mecanismo del teñido de los cueros es difícil de establecer debido a los múltiples y complicados factores que intervienen, tales como acción de los curtientes, estructura fibrosa, neutralización y tipo de colorante utilizado, entre otros. Se cree que los colorantes penetran más fácilmente que los taninos en la piel y que comprenden los mismos principios generales de fijación; esta se realiza por medio de enlaces de hidrógeno, por lo que a valores bajos de pH, mayor será la fijación, sin embargo, también se cree que los colorantes directos, (acción superficial) no son absorbidos sino atraídos más por fuerzas físicas que por enlaces químicos.

La fijación del colorante no depende solo del pH, también depende del peso molecular del colorante, del grado de solubilidad y de sus características ácido base.

Broitman Kutemplon (1972) menciona en su tesis que previo al teñido se agregan agentes emulsificantes para eliminar residuos de grasa que podrían dificultar el trabajo de teñido, posteriormente la solución del colorante se añade a la pieles, mencionando que el tiempo de contacto con la piel dependerá del grado de penetración deseado y de la calidad de la piel a teñir. La temperatura adecuada para teñir fluctúa entre 43 y 60° C.

1.2.11 Engrase.

Esta operación tiene como finalidad ajustar la firmeza o textura del cuero lubricando las fibras. El engrasado también puede servir para incrementar la resistencia del cuero.

El engrase de los cueros es importante pues determina las características de la piel terminada, no-solo físicas sino también estéticas, afecta el quiebre, la resistencia a la tensión y el confort entre otras propiedades.

El engrase consiste en la incorporación de aceite al cuero, a partir de una emulsión, lo cual se efectúa previo al secado. Un engrase adecuado del cuero es resultado del balance habilidoso de los tipos de aceite utilizados y de los métodos para aplicarlos.

Esta operación suele realizarse normalmente en tambores; en la práctica, los tiempos de engrase varían entre 30 y 45 minutos y las temperaturas utilizadas son de entre 45 y 60°C (haciendo una amplia generalización); el porcentaje de aceite va de 3 a 8% con proporciones variables de acuerdo al tipo de aceite que se utilice, tipo de piel a engrasar y las propiedades requeridas.

Es importante aplicar el aceite en forma de emulsión, generalmente los emulsificantes se usan en concentraciones de entre el 1 y el 5%. Es importante la homogeneidad de la emulsión, pues esto confiere mayor estabilidad al sistema. La solubilización de un aceite en agua (para formar la

emulsión), puede hacerse mediante la utilización de un jabón sobre el sistema aceite-agua, el jabón actúa como emulsificante. También puede utilizarse ácido sulfúrico, para formar un aceite sulfonado ($R - SO_3Na$) o sulfatado ($R - O - SO_3Na$). Estos aceites son los más utilizados para el engrase de las pieles, debido a que el grupo sulfonado posee mayor poder dispersivo que el grupo $-COOH$ de los jabones, lo cual permite una mayor solubilización y penetración en la piel. También suelen usarse aceites aminados, parafinas cloradas, aceites-solventes y otros.

A continuación se incluye la tabla 8 donde se ilustra las principales propiedades de los aceite sulfonados y sulfatados.

CARACTERISITICAS	ACEITE SULFATADO	ACEITE SULFONADO
Penetración	Regular	Excelente
Engrase	Superficial	Interno
Finura de flor	Excelente	Mediana
Llenado	Excelente	Mediano
Estabilidad de emulsión	Regular	Excelente
Dispersión de emulsión	Gruesa	Fina
Estabilidad electrolítica	Regular	Excelente
Estabilidad al ácido	Mediana	Excelente

Padilla J. 1977.

Tabla 8

Las propiedades finales de lubricación dependerán no solo de la calidad del engrasante utilizado, sino también del carácter fisicoquímico de la piel y del método de aplicación.

Se han mencionado algunos aceites utilizados para engrasar, pero los engrasante comerciales rara vez constan de un solo componente, la

mayoría de los aceites son sistemas múltiples; por esto los productos clásicamente utilizados pueden ser, aceite de manitas, de esperma, de bacalao, de ricino, de soya, de pescado, de coco, de mantecas. El aceite de manitas mejora la resistencia al desgarre y el de esperma de ballena posee gran capacidad de penetración al cuero, aumentando con esto la resistencia al desgarre. Es importante destacar el uso de aceites minerales, pero no se debe olvidar que éstos aunque ayudan a la penetración y lubricación no son fijados y pueden migrar. Pueden usarse aceites crudos para buscar una lubricación superficial.

En orden creciente de suavidad impartida al cuero se encuentran: el aceite de manitas sulfatado, mezcla de aceite de manitas y de pescado sulfatado y aceites marinos sulfitados, principalmente. Como regla general se dice que un aumento en la cantidad de aceite producirá una piel más suave, sin embargo, demasiado aceite podría dar como resultado una piel muy floja y sin consistencia.

1.2.12 Secado.

El secado es una de las operaciones más importantes en cuanto a la calidad de las pieles. Con esta operación se busca que el contenido de humedad sea el mismo en el interior y en el exterior de las pieles.

Es costumbre secar las pieles hasta un contenido tan bajo de humedad mediante el cual se logre la fijación de los materiales dentro de la misma.

El secado implica la transferencia de líquido desde un sólido húmedo hasta una fase gaseosa. Se prefiere el secado mediante aire, siendo conveniente la transferencia de calor mediante convección; el aire atmosférico siempre contiene cierta cantidad de humedad y al aumentar la temperatura del aire, aumenta también su capacidad portadora de humedad, por este motivo, las pieles no suelen secarse al aire atmosférico.

En el secado de las pieles es importante la posición en que se sequen, se recomienda colgarlas en posición laminar vertical y pasar el aire hacia abajo de las superficies de las láminas, en lugar de pasarlo horizontalmente. El secado de las pieles cesa cuando se ha alcanzado un equilibrio en cuanto al contenido de humedad, alrededor de 10-12%.

Los tiempos de secado pueden ir de 30 minutos a dos o tres horas y las temperaturas manejadas dependen del tipo de cuero, del curtido y de la firmeza deseada, aunque generalizando se puede decir que se utilizan temperaturas de entre 38-64°C. (Padilla, 1977). Un ascenso en la temperatura puede provocar una disminución en la humedad relativa provocando, que aumente la capacidad del aire para tomar humedad. Si lo que se busca es reducir el tiempo de secado, pueden aumentarse las velocidades utilizadas del aire.

Sin embargo no solo existe el secado por medio del aire, también existe el secado al vacío, este método también utiliza el calor por medio de placas cromadas y las temperaturas manejadas son alrededor de 40°C.

1.2.13 Acabado.

El acabado es una de las operaciones más complicadas durante todo el proceso, contribuye a la durabilidad, belleza de la piel y suavidad, proporciona al cuero una cierta resistencia a la abrasión y a la decoloración, incluso puede mejorar el color del cuero, entre otras propiedades.

El acabado consiste en la aplicación de ciertas sustancias de revestimiento. El equipo empleado en la aplicación de la capa de acabado depende del producto que se utilice. Los acabados de las pieles varían mucho dependiendo del uso final y del tipo de superficie deseada, existen diversas sustancias que pueden utilizarse para realizar el acabado. En la tabla 9 se mencionan algunos materiales usados para el acabado de la piel.

MATERIALES PARA EL ACABADO
Polímeros de acrilato.
Albúmina de sangre
Albúmina d huevo.
Polímeros de butadieno.
Caseína.
Aceite de linaza.
Nitrocelulosa.
Poliuretano.
Copolímeros de uretano-acrilato.
Polímeros de vinilo.
Ceras frutales.
Isinglas (cola e pescado).
Shellac (excreción resinosa de un insecto).

Hansen, Ockerman, 1994

Tabla 9

Los métodos de aplicación de acabados son muy diversos y van desde la aplicación a mano (con brochas, estopas), esparado (con aire, sin él o con pistola), hasta máquinas sofisticadas. Uno de los modelos más comunes para realizar el acabado es la llamada "máquina de sazonar", la cual bombea líquido de acabado sobre una línea de vertido sobre un rodillo, para ser transferido a un cepillo rotatorio que lo deposita en el cuero.

Cuando el acabado sólo permanece en la superficie y no penetra lo suficiente, entonces tiende a levantarse ante la flexión de la piel, provocando un aspecto poco agradable.

Después de que han pasado por el proceso de acabado, los cueros deben ser secados. Uno de los procedimientos más utilizados consiste en hacer pasar los cueros por un largo túnel con aire calentado por vapor o por rayos infrarrojos. Para obtener resultados óptimos se recomienda la aplicación de varias capas de acabado con desecación intermitente entre cada aplicación. Finalmente el cuero es sometido al "planchado", procedimiento que afina la superficie de las pieles; se realiza comúnmente sometiendo al cuero a planchas de cierto peso.

1.3 QUIMICA DEL PROCESO XIPE.

1.3.1 Generalidades.

El proceso Xipe representa una alternativa revolucionaria en la tradicional industria del curtido de pieles, esta innovadora alternativa presenta diversas ventajas respecto al curtido tradicional (curtido al cromo). En el desarrollo del proceso Xipe, no se deposita material contaminante en los efluentes y el consumo de agua requerida es mínimo (Solis, 1978).

En el año de 1959 los químicos mexicanos Eusebio del Cueto y Pedro Villa iniciaron un largo camino de investigaciones personales; al final, los esfuerzos y la dedicación fueron coronados por el éxito. El químico Eusebio de Cueto llegó al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con las bases del "Proceso Xipe".

El 8 de febrero de 1975, el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, la Universidad de Guadalajara y distinguidos curtidores presentaron a las autoridades del país, a la comunidad científica, a los industriales del ramo y al mundo, una nueva tecnología para la preparación y curtido de pieles: "El proceso Xipe". (CONACYT, 1975)

Es importante recordar que la idea primordial de este método alternativo es disminuir en la medida posible, el consumo irracional de agua que existe actualmente en el curtido tradicional.

La industria del cuero tiene la no envidiable reputación de ser una de las más sucias y mal olientes de las industrias conocidas (Thortensen,1985) y es bien sabido que la mayor parte de la carga contaminante (75-80 %) en las aguas residuales de las tenerías del cuero al cromo, es producida por los trabajos de ribera (llamado así porque se realizaba cerca del río) y principalmente por el remojo y el depilado (Van Ulimmeren,1975)

Con el fin de disminuir el consumo de agua corriente, este método propone la utilización de una disolución acuosa salina NaCl (a una concentración menor a la que poseen las propias pieles) y modificar el pH, con una base (NaOH por ejemplo).

La tabla 10 muestra en resumen los pasos mas importantes del trabajo que se propone mediante el proceso Xipe y el diagrama 3 muestra dicho proceso.

ETAPA	REACTIVO
Primer remojo.	Disolución acuosa de NaCl (18 -22° Be.)
Descarne, recorte y lavado.	Utilización de disolución acuosa de NaCl.
Segundo remojo.	Igual que en el primer remojo.
Depilado	NaOH a 18 °Be. (18-22°Be., T. ambiente).
Lavados (3)	Con solución acuosa de NaCl 18 °Be.
Apelambrado	Disolución acuosa de NaCl a (18-22°Be, T. ambiente).
Lavado final.	Disolución acuosa de NaCl 18-22°Be.
Curtido.	Se realiza la adición de cromo 33% basicidad. Los pasos restantes se realizan de igual forma que en proceso tradicional

Tabla 10

DIAGRAMA DE CURTIDO, PROCESO XIPE. PARA 100g DE PIEL.

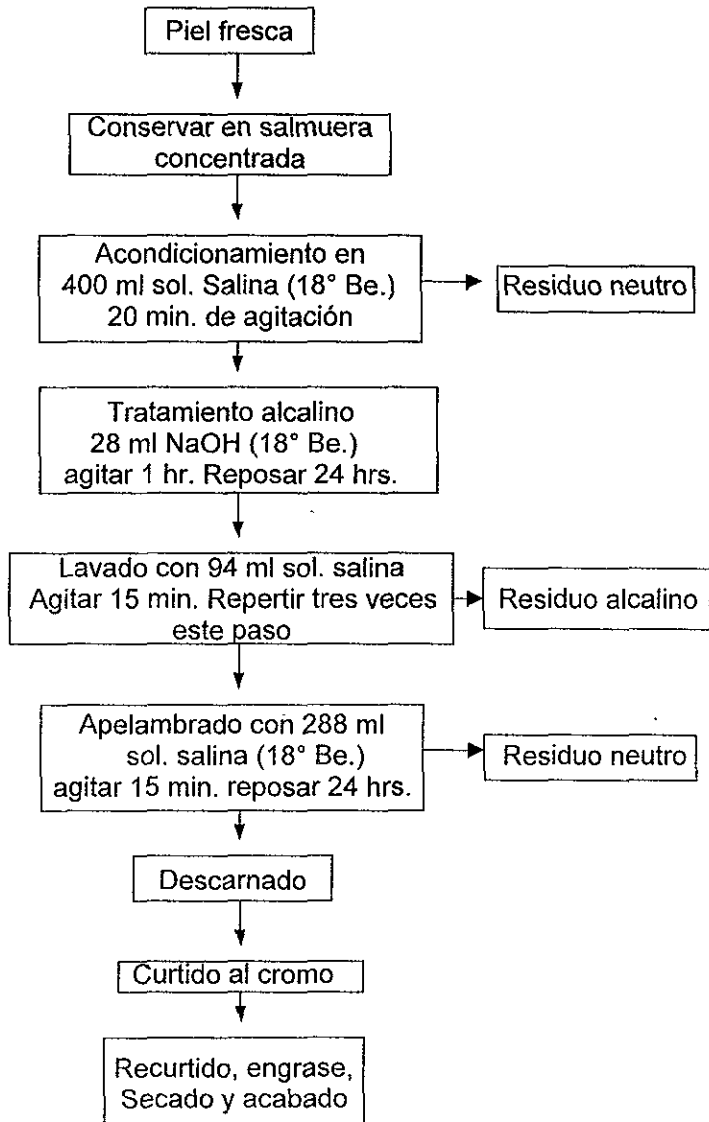


Diagrama 3

1.3.2 Principales características en el proceso Xipe.

Como se mencionó al principio, la gran descarga de residuos y utilización del agua se concentran en los procedimientos previos al curtido, dentro de estos procedimientos se encuentran la conservación de la piel, el remojo y el depilado, por eso el proceso Xipe se centra en estas etapas.

1.3.3 Remojo (solución salina).

La idea fundamental en la propuesta de del Cueto es no usar agua como tal en los remojos, en lugar de agua propone emplear una solución acuosa salina.

La salmuera consiste en la disolución de una sal en agua, para los fines de esta metodología, no es necesario utilizar cloruro de sodio (NaCl), ya que pueden emplearse otras sales como sulfato de sodio, potasa cáustica, sulfato de potasio o mezclas y también para casos muy especiales, sales orgánicas en disolución acuosa, a las concentraciones que se requieran. Sin embargo la sal más empleada es el cloruro de sodio. La salmuera es muy importante debido a que durante todo el proceso se seguirá utilizando.

El remojo de las pieles con salmuera provoca histéresis (migración de las moléculas de agua hacia el interior de la piel), dando como resultado la hidratación de la piel.

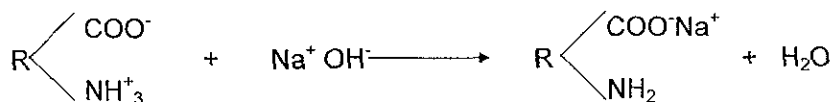
Una vez hidratadas, las pieles se someten a un descarne manual con el propósito de eliminar materia no deseada como podrían ser grasa, o restos de carne.

1.3.4 Depilado.

En el proceso tradicional se utiliza NaOH y $\text{Ca}(\text{OH})_2$ para la etapa del depilado. En este caso solamente se utiliza una solución de NaOH (18-22°Be) en ningún momento existe la adición de $\text{Ca}(\text{OH})_2$

La solución de sosa destruye las proteínas del folículo piloso sin atacar a la cistina del pelo (CONACYT, 1975); la NaOH también permite la saponificación de las grasas presentes en la piel, esto da como consecuencia la formación de jabones, los cuales se encargan de limpiar la fibra colágena para su tratamiento posterior.

Es importante destacar algunas de las reacciones químicas mas importantes que se llevan a cabo en este procedimiento de depilado: Primero, el colágeno se combina con una cantidad apreciable de NaOH.



La reacción anterior solo se da con los aminoácidos libres o con las cadenas laterales del ácido aspártico y glutámico.

En el proceso se menciona que hay producción de amoníaco debido al desprendimiento del amoníaco de las bases volátiles presentes, por la acción del alcali.

En el proceso de depilado tradicional se utiliza la adición de Ca(OH)_2 y sulfuro de sodio, este paso ha sido estudiado y se ha llegado a la conclusión de que adicionar Ca(OH)_2 y sulfuro de sodio equivale a adicionar NaOH en aproximadamente la mitad.

De esta manera, el proceso Xipe permite un ahorro en cuanto a materiales utilizados, además de que la toxicidad de la solución empleada disminuye al utilizar solo NaOH.

1.3.5 Apilambrado.

Una vez realizado el depilado mediante la acción del NaOH, se realizan tres lavados con solución salina (igual a la utilizada en la etapa de remojo), de esta manera se logra eliminar el exceso de álcali que presenta la piel.

Los lavados permitirán obtener la parte más importante de los residuos, es decir aquellos donde el material presente es producto de la acción del NaOH.

Después de los tres lavados se realiza el apilambrado que consiste en reposar las pieles en solución salina para de esta manera obtener una

piel con un hinchamiento y un pH adecuados para su posterior tratamiento: el curtido.

1.3.6 Curtido.

A diferencia del proceso tradicional, en el proceso Xipe no es necesario el picle para llevar a cabo el curtido con cromo, el pH de la piel queda ajustado después del apelmbrado, la piel pasa de un pH casi de 14 (adición del NaOH) hasta un pH de 10, valor que permite la acción del cromo para curtir.

De aquí que el proceso Xipe, en esta etapa promueve:

- Una mayor difusión de la solución de sulfato básico de cromo dentro de la piel. En el proceso tradicional la difusión es lenta e irregular.
- No provoca el depósito interno en la piel de sales insolubles de cromo, dado que la solución que entra junto con el sulfato básico de cromo posee un pH de 2 logrando casi la completa neutralización del exceso de NaOH instantáneamente.

La operación de curtido en el método Xipe se realiza de la misma manera aparente que en el proceso tradicional, excepto que el cuero está totalmente traspasado en 30 minutos en comparación con el tiempo que se lleva el proceso tradicional que es de 8 a 24 horas (CONACYT, 1975).

1.3.7 Subproductos generados en el proceso Xipe.

Las diferencias que presenta el proceso tradicional frente al proceso Xipe son muy marcadas, es importante notar que estas diferencias permiten vislumbrar varios puntos importantes a favor del proceso Xipe, por ejemplo:

- El decremento en el consumo de agua es muy significativo.
- Así mismo, la cantidad de reactivos utilizados en el proceso Xipe es mínimo en comparación con el proceso de curtido tradicional.
- Los residuos generados mediante el proceso Xipe no implican riesgos al medio ambiente, estamos hablando de residuos no peligrosos.
- Finalmente y como consecuencia es probable que el costo de implementación de un proceso Xipe sea menor al del proceso tradicional.

En la tabla 11 se presentan los pasos empleados en proceso de curtido tradicional y el Xipe:

E T A P A.	TRADICIONAL.	XIPE.
Conservación.	✓	✓
Remojo.	✓	✓
Depilado.	✓	✓
Desencalado.	✓	×
Rendido.	✓	×
Picle.	✓	×
Curtido.	✓	✓
Neutralización.	✓	×
Recurtido.	✓	✓
Teñido	✓	✓
Engrase.	✓	✓
Secado.	✓	✓
Acabado.	✓	✓

✓ si se realiza.

× no se realiza

Tabla 11

Con este tipo de curtido, al final se tienen efluentes (diagrama 3), que pueden separarse en dos fases, una líquida y una sólida y a diferencia del tradicional no son tóxicos

Los principales componentes de dichos efluentes se presentan en la tabla 12

FASE LIQUIDA	FASE SOLIDA
Disolución acuosa de NaCl.	Algunas Proteínas.
Disolución acuosa neutra, básica o ácida.	Proteínas y Lípidos.

Tabla 12

La fase líquida se trata posteriormente con HCl o NaOH para precipitar los componentes de la piel que pudieran estar presentes, coagularlos o flocularlos. El resto de la fase líquida puede volverse a utilizar en el proceso, una vez que haya sido ajustada al pH y salinidad deseados.

Los componentes de la fase sólida pueden recuperarse en forma de lodos salados a un pH adecuado. Los subproductos valiosos pueden ser recuperados en óptimas condiciones.

1.3.8 Canalización de los subproductos del proceso Xipe.

El Ingeniero Eusebio del Cueto menciona que alrededor de 80,000 toneladas de proteínas queratínicas son llevadas anualmente por las aguas residuales de tenerías del mundo. Esta cifra puede darnos una idea de la

importancia que tiene la propuesta de un curtido con un consumo mínimo de agua y que genera residuos no tóxicos.

El adecuado tratamiento de los desechos, su caracterización y cuantificación puede dar como resultados diversas sustancias de alto valor agregado, las cuales pueden canalizarse a diferentes industrias como se muestra en la tabla 13.

MEDICINA HUMANA.	INDUSTRIA ALIMENTARIA.	INDUSTRIA FARMACEUTICA.	AGRICULTURA.	INDUSTRIA QUIMICA.	INDUSTRIA DEL CUERO.
Prótesis.	Gelatina	Hidrolizados de colágeno.	Forrajes.	Preparación de tensoactivos biológicos (*)	Cuero semisintético (**)
Productos para suturas.	Tripas artificiales.	Medios nutritivos (para producción de antibióticos)	Abonos nitrogenados.		
Espuma de colágeno.	Concentrados de aminoácidos.	Cápsulas para medicamentos.			
Disoluciones de sustitución de plasma	Concentrados de péptidos				

* Con poder disociante constituidos esencialmente de proteínas.

** A base de no-tejidos, en fibras de colágeno.

Del Cueto, 1991

Tabla 13

1.4 ESTRUCTURA Y COMPONENTES DE LA PIEL.

Los métodos de curtido usan como materia prima la piel, es por ello, que para conocer los componentes que posiblemente presenten los residuos del proceso de curtido, es necesario conocer un poco acerca de la composición de esta.

1.4.1 Piel y tejido conjuntivo.

La piel forma la envoltura externa de los organismos. Esta compuesta de dos capas:

- Epidermis
- Dermis

La epidermis es la capa exterior mas delgada que actúa como una barrera contra infecciones y perdida de humedad, se extiende hacia abajo en forma de invaginaciones tubulares formando la superficie de los folículos pilosos (Hansen, Ockerman, 1994), esta compuesta por distintas capas de células, en ellas puede encontrarse queratinositos y un pequeño número de melanositos los cuales son los responsables de la pigmentación de la piel.

La dermis es la capa interna de la piel cuyo desarrollo determina el grosor de ésta, provee la fuerza y la resistencia mecánica. Se compone de tejido conectivo fibroso y se divide en dos zonas, la dermis papilar y la dermis reticular. Dentro de la dermis papilar se encuentran delgadas fibras de colágeno y elastina, debajo de esta se encuentra la dermis reticular, y

distribuido entre estas dos se encuentran materiales compuestos de proteínas (predominantemente fibronectina) y glicosaminoglicanos (ácido hialurónico, sulfato de condroitina y dermatan sulfato) (Morgan, Martín, 1997).

El tejido conectivo recibe este nombre porque conecta diferentes tejidos, esta compuesto de sustancias intercelulares que se clasifican en:

- Fibras intercelulares.
- Componente intercelular amorfo.

Las fibras intercelulares son el colágeno, la elastina y las reticulares.

1.4.2 Colágeno.

El colágeno es la proteína más abundante en los mamíferos, constituye una cuarta parte de su peso total; el papel más importante que desempeña es el de sostén de todos los organismos multicelulares. Sin el colágeno los animales quedaría reducidos a un montón de células interconectadas por algunas neuronas. (Cutran, 1990).

El colágeno, es el principal elemento fibroso de la piel, huesos, tendones, cartílagos, dientes, vasos sanguíneos y córnea. En mayor o menor proporción está presente en casi todos los órganos.

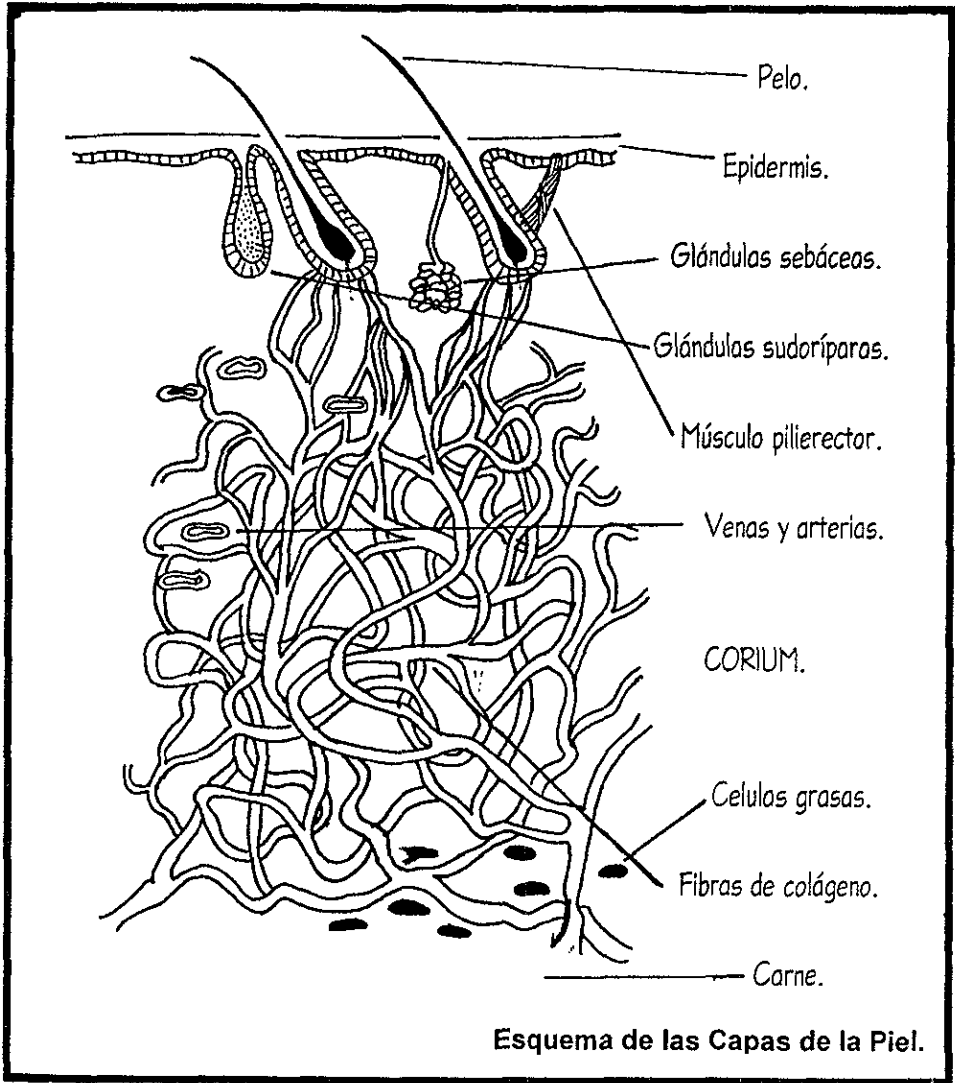


Figura 5

Además de su función estructural en los tejidos maduros, el colágeno desempeña un papel dirigente del desarrollo tisular.

La unidad básica estructural del colágeno es el *tropocolágeno*, un largo filamento cuyo peso molecular es de 285,000 daltons (Cutran, 1990) y que está constituido por tres cadenas polipeptídicas del mismo tamaño y su composición depende del tipo de colágeno (tabla 15). Cada cadena polipeptídica del tropocolágeno tiene una conformación individual, se enrolla hacia la izquierda, mientras que al unirse las tres cadenas (arreglo del tropocolágeno) forman una triple hélice enrollándose una sobre otra hacia la derecha. En este caso no existen enlaces disulfuro como los hay en las hélices alfa del colágeno, en el tropocolágeno, los enlaces de hidrógeno unen a las tres cadenas entre sí, estabilizándose además con fuerzas de Van der Waals. (Soto, 1988). Existen varios tipos de colágeno, que se muestran en las tablas 14 y 15, pero no todos están bien caracterizados.

TIPO DE COLAGENO	CADENAS	DISTRUBUCION
I (intersticial o fibrilar)	$[\alpha 1(I)]_2, \alpha 2$	Es el más abundante y ampliamente distribuido, forma fibras grandes, se encuentra en, piel, tendones, ligamentos, huesos córnea.
II (intersticial o fibrilar)	$[\alpha 1(II)]_3$	Se encuentra en adultos sólo en la matriz del cartilago y algunas veces en la notocorda embrionaria, forma fibra delgadas
III (intersticial o fibrilar)	$[\alpha 1(III)]_3$	Es similar al tipo I, pero se encuentra más glucosilado, forma redes de fibrillas delgadas que rodean y apoyan tejidos blandos flexibles se encuentra principalmente en piel fetal, sistema cardiovascular y fibras reticulares.

Cutran, 1990

Tabla 14

TIPO DE COLAGENO	CADENAS	DISTRUBUCION
IV (amorfo)	$[\alpha 1(IV)]_2, \alpha 2(IV)$	Es el principal tipo de colágeno en la lámina membrana basal. No forma fibras o fibrillas.
V (amorfo)	$[\alpha 1(V)]_2, \alpha 2(V)$	Se encuentra en las membranas basales y vasos sanguíneos placentarios. Su estructura y función están poco caracterizadas
VI	$[\alpha 1(VI)]_2, \alpha 2(VI)$	Función desconocida.
VII	$[\alpha 1(VII)]_3$	Función desconocida.
VIII (probablemente amorfo)	$[\alpha 1(VIII)]_3$	Específico del endotelio.
IX	$[\alpha 1(IX)], \alpha 2(IX), \alpha 3(IX)$	Cartilago.
X	$[\alpha 1(X)]_3$	Se encuentra en la matriz que rodea a los condrocitos hipertróficos del cartilago de la placa de crecimiento en degeneración en los sitios de la futura formación ósea

Cutran, 1990.

Tabla 15

Respecto a los aminoácidos presentes en la molécula del colágeno encontramos que cada cadena tiene una secuencia de aminoácidos triple, repetitiva, siendo el tercer aminoácido la *glicina* una característica extraña, ya que esta proporción resulta anormalmente elevada para una proteína, siendo casi de un tercio, también la prolina esta presente en mayor proporción en el colágeno que en la mayoría de las proteínas.

La secuencia de aminoácidos del colágeno es notablemente regular y periódica, además la secuencia glicina-prolina-hidroxiprolina se repite con frecuencia. La molécula de colágeno posee dos aminoácidos poco frecuentes en las proteínas, hidroxiprolina e hidroxilisina (figura 6). Contiene también pequeñas cantidades de tirosina y no contiene triptofano ni cistina (Soto, 1988). En la tabla 16 se muestra el perfil de aminoácidos del colágeno.



Figura 6

Muchas veces la lisina contenida en el colágeno suele oxidarse, dando lugar a enlaces cruzados entre las cadenas polipeptídicas, factor que confiere resistencia al tejido conjuntivo, es así que los enlaces cruzados son un importante contribuyente para la resistencia tensil del colágeno.

El colágeno es una molécula insoluble y en estado nativo resistente a la digestión, factor que causó muchos problemas para llevar a cabo su caracterización química, sin embargo se descubrió que el colágeno extraído de animales jóvenes si es soluble, pues su entrecruzamiento es aún limitado. Gracias a esta característica fue posible extraer la estructura básica del colágeno (tropocolágeno) en forma intacta (Soto, 1988). La molécula de colágeno es muy interesante, además de encontrarse en gran proporción en los mamíferos, es una proteína muy resistente, se necesita una carga de al menos 10 kilogramos para romper una fibra de un milímetro de diámetro. (Strayer, 1990).

Como ya se mencionó, el colágeno es insoluble en soluciones neutras y a menos que sea sometido al calor o a una degradación química y/o bacterial, el colágeno no se separará en una solución acuosa (Ramírez, 1973).

El colágeno puede ser obtenido de forma comercial a través de una digestión térmica e hidrólisis, y algunas de sus propiedades se presentan a continuación.

Propiedades de los colágenos comerciales

Las preparaciones comerciales más comunes de colágeno son: colágenos solubles, hidrolizados de colágeno y complejos polipeptídicos a base de colágeno.

- El colágeno soluble es miscible en agua y mezclas de agua-alcohol. Es insoluble en ceras y aceites.
- El colágeno se encuentra como una solución en forma coloidal.
- El colágeno es prácticamente inodoro e incoloro por lo que no afecta los productos a los que se quiera incorporar.
- El colágeno contribuye a mejorar la humectación de la piel, pues retiene el agua.

Aplicaciones del Colágeno.

- Se utiliza principalmente en la manufactura de cremas y emulsiones líquidas.
- Puede utilizarse en productos para el cabello como shampoos.
- Los hidrolizados de colágeno pueden utilizarse en mascarillas faciales, lápices labiales, productos para el cuidado de las uñas y otros cosméticos.
- Otro uso de los hidrolizados de colágeno es recubriendo alimentos y emulsiones.
- En medicina el colágeno se utiliza (en inyecciones), como cicatrizante de heridas.

Desde el punto de vista nutricional el colágeno no es una buena fuente de proteínas, es pobre en aminoácidos indispensables. En estado natural resiste la digestión por la tripsina y la quimotripsina, sin embargo se hidroliza por la pepsina y la colagenasa (Cheftel, Lorient, 1989).

1.4.3 Elastina.

La elastina es una proteína fibrilar insoluble que se encuentra en las fibras elásticas amarillas que entrelazan las capas externas de la dermis, difiere del colágeno porque es muy poco estructurada y posee ramificaciones.

Se encuentra en muchos tipos de tejido conectivo, junto con colágeno y polisacáridos. Es el componente principal de las fibras elásticas que pueden estirarse hasta varias veces su longitud y volver rápidamente a su forma y tamaño original cuando cesa la tensión (Strayer, 1990).

Los ligamentos elásticos prominentes del cuello de algunos animales, la aorta y tejidos cardiovasculares son una fuente especialmente rica en elastina; las concentraciones de elastina son variables dependiendo del tipo de tejido del que se trate; existe relativamente poca elastina en la piel, tendones y tejido conjuntivo .

La elastina y el colágeno se encuentran íntimamente ligados en la dermis y son el principal soporte de los tejidos de la piel, el colágeno provee estructura y la elastina elasticidad y flexibilidad; bajo la epidermis la elastina constituye alrededor de un 5% y el colágeno un 70% (Bolaños, 1989).

La composición de aminoácidos de la elastina es muy particular (tabla 16), un tercio de sus residuos son de glicina; es rica en prolina y alanina, contiene muy poca hidroxiprolina y no contiene hidroxilisina ni histidina,

CONTENIDO DE AMINOACIDOS DEL COLAGENO Y LA ELASTINA

AMINO ACIDO	%aa. COLAGENO BOVINO	%aa. ELASTINA BOVINA
Ac. Aspártico	5.50	0.35
Hidroxiprolina	12.1	1.70
Treonina	2.00	0.87
Serina	2.70	0.68
Ac. Glutámico	10.00	2.40
Prolina	12.70	13.40
Glicina	19.90	22.50
Alanina	7.60	15.10
Cistina	0.00	0.28
Valina	2.90	12.5
Metionina	0.70	0.18
Isoleucina	---	---
Leucina	4.80	10.1
Tirosina	1.30	1.40
Fenilalanina	3.70	4.40
Histidina	0.70	0.04
Lisina	4.00	0.39
Arginina	7.90	0.88
Triptofano	0.00	0.00
<i>Total</i>	99.6	87.2

Anson et. al. 1952.

TABLA16

además posee pocos aminoácidos polares (ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, triptofano y tirosina) y un poco más de aminoácidos no polares (glicina, prolina, alanina, valina, leucina). La elastina contiene dos derivados de aminoácidos únicos llamados desmosina e isodesmosina (figura 7), los cuales entrelazan transversalmente las moléculas de tropoelastina.

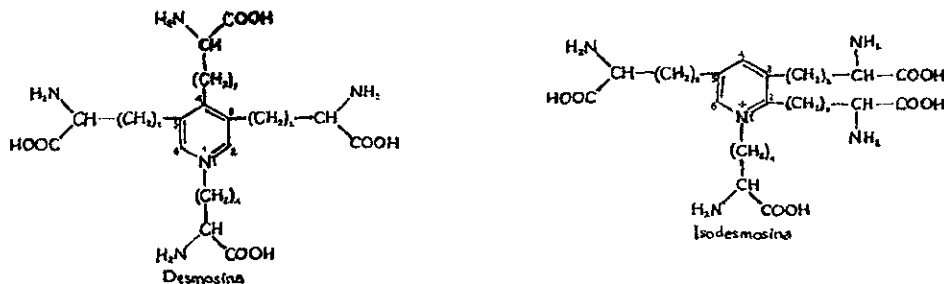


Figura 7

La tropoelastina es una proteína con un peso molecular de 70,000 daltons, aparece para ser el intermediario soluble en la biosíntesis de la elastina (insoluble). Sin embargo también se tiene evidencia de otra proteína intermediaria (120,000-130,000 daltons) llamada proelastina; Foster y colaboradores aislaron esta proteína, sugiriendo que se trataba del precursor primario en la síntesis de la elastina. La elastina tiene un peso molecular que se encuentra entre 68,000 y 84,000 daltons (Hans).

Se considera que la elastina posee una elasticidad parecida a la del caucho y se cree que esto se debe en mucho a las uniones covalentes transversales de las moléculas en la cadena principal, similar al caso del caucho vulcanizado.

La elastina juega un papel muy importante dentro de los organismos, la modificación de la estructura y la disminución en la producción de esta proteína durante el proceso de envejecimiento son en gran parte, responsables de ciertas enfermedades degenerativas, de la aparición de arrugas así como de la pérdida de elasticidad y flexibilidad de la piel.

Aislamiento y purificación.

La elastina comenzó a aislarse como proteína pura en forma de hidrolizado y en solución entre los años 1950 y 1975.

La elastina suele obtenerse como un residuo después de que se han removido otros componentes del tejido conjuntivo, el componente más difícil de separar es el colágeno.

Los tratamientos de hidrólisis ácido-base no son específicos, es por eso que se prefiere la hidrólisis enzimática, debido a la acción específica de las enzimas lo cual puede incluso incrementar el rendimiento.

Existen varios métodos (Bolaños, 1989) para el aislamiento y purificación de la elastina entre los que se encuentran:

1. Con cloruro de guanidina y una mezcla de HCOOH y bromuro de cianógeno.
2. Con guanidina seguida por una digestión con colagenasa.
3. Con piridina y cloruro de calcio.
4. Con ácido clorhídrico y reflujo
5. Por medio de álcali caliente.
6. Mediante el uso de enzimas proteolíticas
7. Con ácido oxálico.

Para la extracción de la elastina en el caso del curtido, se coloca el cuero (curado) en una solución de ácido clorhídrico 0.1N bajo reflujo, de esta forma se destruye la estructura del cuero quedando una capa de elastina intacta, a pesar de las condiciones que impone el ácido fuerte, la capa de elastina no tiene en su superficie la suficiente carga por unidad de masa para ser solubilizada (Ramírez, 1973).

Aplicaciones de la elastina.

- Generalmente se utiliza en forma de hidrolizados.
- Los hidrolizados de elastina tienen una influencia directa sobre el tejido conjuntivo elástico, mejorando la elasticidad.
- Los cosméticos que contienen elastina, aceleran el alivio de heridas y estimulan la síntesis de elastina.
- También se utiliza en shampoos, protege al pelo de las influencias del medio ambiente y de los detergentes alcalinos.

Propiedades de la elastina en cosmetología.

- Posee una capacidad de enlazamiento de moléculas de agua, por lo que actúa como agente hidratante.
- Estimulación de células de la epidermis (Da un aspecto mas joven).
- Mantenimiento de la flexibilidad característica de la piel, atenuando arrugas.
- Mejoramiento de la piel maltratada debido a los efectos y agresiones del medio ambiente como sol, aire y agua.

1.4.4 Proteoglicanos.

Los proteoglicanos son entidades constituidas como su nombre lo dice por polisacáridos (95%) y proteína (5% aproximadamente) (Strayer, 1990). Forman la sustancia base de la matriz extracelular de los tejidos conjuntivos y pueden constituir hasta un 30% del peso seco del tejido.

Son polianiones voluminosos de alto peso molecular que retienen agua y cationes, se encuentran como sustancia base del tejido conjuntivo, desarrollan diversos papeles en la regulación de la estructura y permeabilidad del tejido conjuntivo, condicionan las propiedades viscoelásticas de las articulaciones y otras estructuras sometidas a deformaciones mecánicas.

En general, sus propiedades se asemejan más a las de los polisacáridos que a las de las proteínas, es por eso que también se

nombran como glicosaminoglicanos, entre los cuales encontramos principalmente:

- Acido hialurónico (Cadena principal de los proteoglicanos)
- Condroitín sulfato (A y C).
- Dermatán sulfato (Condroitín sulfato B)
- Queretán sulfatos I y II.
- Heparán sulfato (Heparina).

Estos glicosaminoglicanos se encuentran distribuidos en diversas partes del cuerpo, como se muestra en la tabla 17.

GLICOSAMINOGLICANO.	DISTRIBUCION.
Acido hialurónico.	Piel, cartilago, cordón umbilical, cuerpo vítreo, válvulas cardíacas.
Condroitín sulfato A.	Cartilago, hueso, córnea, cartilago embrionario.
Condroitín sulfato B (Dermatán sulfato).	Piel, tendón, ligamentos, cordón umbilical, válvulas cardíacas.
Condroitín sulfato C.	Cartilago, tendón, cordón umbilical, discos espinales.
Queretán sulfato I.	Córnea.
Queretán sulfato II.	Cartilago, tendón, cordón umbilical, válvulas cardíacas, discos espinales.
Heparán sulfato (Heparina).	Hígado, pulmón, pared arterial.

Tabla 17

Cada uno de los glicosaminoglicanos son polisacáridos no ramificados formados de unidades de disacáridos repetidas teniendo un amino azúcar como componente que siempre se encuentra en forma de glucosamina o

galactosamina. Todos, excepto el ácido hialurónico, contienen residuos de monosacáridos con grupos sulfatos en oxígeno o en nitrógeno.

Los proteoglicanos son (en su tamaño molecular) substancialmente mayores que las glucoproteínas. Los diferentes glicosaminoglicanos varían en su tamaño con pesos moleculares que van de 10^4 para la heparina, hasta 10^5 a 10^7 para el ácido hialurónico, el cual posee un importante papel estructural en la formación de agregados de proteoglicanos (White, Smith, 1983).

De esta manera tenemos que un proteoglicano es una entidad formada por cadenas de glicosaminoglicanos unidos a la larga cadena individual de polisacáridos del ácido hialurónico, las cuales están constituidas por una unidad disacárida que se repite en forma continua, como se indica en la tabla 18

GLICOSAMINOGLICANOS	UNIDAD DE REPETICION DE DISACARIDOS
Heparán sulfato.	N-acetilglucosamina y ác. glucurónico o ác. idurónico.
Condroitín-4-sulfato. Condroitín-6-sulfato.	N-acetilgalactosamina y ác. glucurónico.
Dermatán sulfato.	N-acetilgalactosamina y ác. glucurónico o idurónico.
Queratán sulfato	N-acetilglucosamina y galactosa.

Cormack D. 1988

Tabla 18

Acido hialurónico.

El ácido hialurónico forma la columna vertebral de los proteoglicanos, consiste en una cadena no ramificada de unidades de los disacáridos N-acetil glucosamida y ácido glucoronico (figura 8), repetidas; existe no solo en algunas partes de los animales sino también en las bacterias.

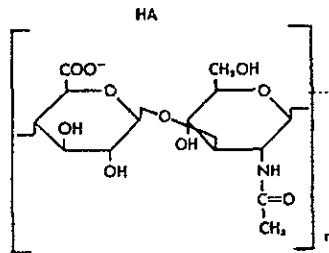


Figura 8

Su contenido proteínico no ha sido especificado aún pero se habla de preparados con un contenido de proteína del 1 al 2%. El ácido hialurónico juega un papel muy importante en la formación de agregados de los proteoglicanos debido a que las subunidades de glicosaminoglicanos (queratán y condroitín sulfato) se encuentran unidos a una cadena de ácido hialurónico, de manera que la columna o guía principal es el ácido hialurónico y las ramificaciones (subunidades) son el queratán y condroitín sulfato.

Condroitín sulfatos.

Constituyen dos de los glicosaminoglicanos más ampliamente distribuidos, el Condroitín 4-sulfato y el Condroitín 6-sulfato, estos difieren en

la posición del éster sulfato, es decir en el 4- y 6-hidroxilo de la N-acetilgalactosamina (figura 9), respectivamente (White et. al., 1983).

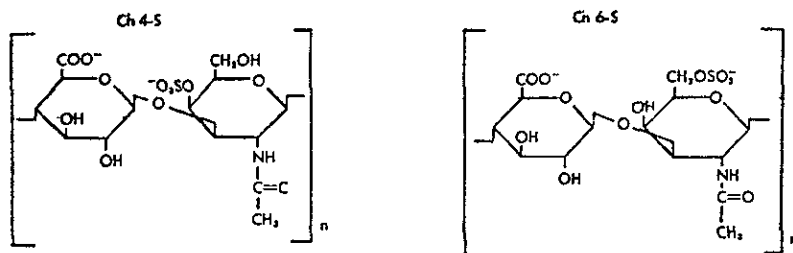


Figura 9

Los pesos moleculares en preparaciones de condroitín sulfato generalmente van de 1×10^4 a 6×10^4 , siendo la mayoría polidispersos. Frecuentemente suelen diferenciarse de un tejido a otro en el grado de sulfatación y además pueden encontrarse independientes.

Los sulfatos de condroitina se unen de manera estrecha al ácido hialurónico mediante la acción de "proteínas ligadoras" que se fijan por medio de enlaces hidrófobos al ácido hialurónico y a la proteína basal.

Dermatán Sulfato

Estos proteoglicanos se diferencian de los condroitín sulfato porque contienen ácido L-idurónico (figura 10). Se encuentran también en la unidad repetitiva pequeñas cantidades de ácido glucurónico, reemplazando al ácido idurónico.

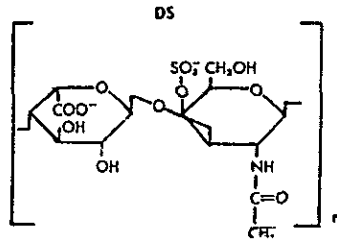


Figura 10

Queratán Sulfato

Los queratán sulfatos I y II contienen la misma unidad repetitiva de disacárido (figura 11), sin embargo se diferencian entre sí por su contenido glucídico global y se encuentran en tejidos diferentes. El queratán sulfato I es aislado de la córnea y el queratán sulfato II es aislado del cartílago y del hueso.

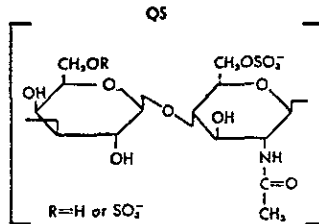


Figura 11

Principales funciones y propiedades de los proteoglicanos

- Tienen la capacidad de unirse al sodio y al potasio, propiedad que atrae agua por presión osmótica, contribuyendo así a la turgencia de la matriz extracelular.
- Los glicosaminoglicanos se transforman en gel a concentraciones relativamente bajas, utilizándose como microfiltros.
- Se cree que las altas concentraciones de ácido hialurónico y sulfato de condroitina presentes en el cartílago contribuyen a su compresibilidad.

- La heparina es un importante anticoagulante, posee acción sobre la antitrombina III plasmática.
- El ácido hialurónico permite que células tumorales emigren a través de la matriz extracelular.
- El sulfato de queratán I contribuye a la transparencia de la córnea.
- La gran viscosidad del ácido hialurónico sugiere que puede servir de lubricante en las articulaciones para enfermedades reumáticas
- Los proteoglicanos impiden el paso del agua a una presión externa dando al tejido elasticidad y resistencia a la compresión.

Obtención de proteoglicanos.

Es posible la obtención de una mezcla de proteoglicanos y colágeno a partir de cartilago de diversos tejidos. Los proteoglicanos pueden posteriormente ser separados mediante ultracentrifugación.

La fracción del proteoglicano, llamada *agregados de proteoglicano* puede ser dissociada y posteriormente fraccionada por ultracentrifugación en un gradiente de densidad de CsCl, obteniéndose ácido hialurónico, proteoglicanos degradados denominados *subunidades de proteoglicanos* y proteínas de bajo peso molecular.

1.5 PURIFICACION E IDENTIFICACION DE PROTEINAS.

1.5.1 Separación de proteínas

Aprovechando las diversas características de las proteínas en disolución, se ha conseguido separar mezclas de proteínas basándose en: Tamaño molecular, solubilidad, carga eléctrica, diferencia en sus características de adsorción y afinidad biológica por otras moléculas.

Dentro de estas técnicas, una de las más sencillas es la separación de las proteínas por solubilidad. Esta técnica puede estar dada por medio del pH o bien la fuerza iónica del medio. Las sales neutras ejercen efectos pronunciados sobre la solubilidad de las proteínas. A baja concentración, las sales incrementan la solubilidad de muchas proteínas, fenómeno que recibe el nombre de "salting in". Las sales de los iones divalentes tales como el $MgCl_2$ y el $(NH_4)_2SO_4$, son mucho más eficaces en la solubilización de las proteínas que las sales de iones monovalentes tales como el NaCl, el NH_4Cl y el KCl. La capacidad de las sales neutras para influir en la solubilidad de las proteínas esta en función de su fuerza iónica, que constituye una medida tanto de las concentraciones como del número de las cargas eléctricas existentes en los cationes y los aniones aportados por la sal. El efecto de solubilidad por salado esta causado por cambios de la tendencia a la ionización, de los grupos R disociables de la proteína.

Por otra parte. a medida que la fuerza iónica aumenta, la solubilidad de una proteína comienza a disminuir. A una fuerza iónica lo

suficientemente elevada, una proteína puede ser casi completamente precipitada de su disolución, efecto llamado "salting out".

Las proteínas precipitadas por salado retienen su conformación nativa y pueden disolverse de nuevo, normalmente sin experimentar desnaturalización. El sulfato de amonio es la sal más usada para precipitar las proteínas por salado, esto, debido a su gran solubilidad en agua, lo que permite alcanzar fuerzas iónicas muy elevadas, además que previene el crecimiento bacterial y protege a la mayoría de las proteínas de la desnaturalización. (Murray, 1997).

Aunque la separación de proteínas por saturación es muy usada, existen técnicas más sofisticadas y que brindan mayor información, tal es el caso de la cromatografía de exclusión molecular, conocida también como filtración sobre gel o cromatografía de tamiz molecular la cual difiere de la cromatografía de intercambio iónico debido a que ésta separa los solutos basándose en la carga eléctrica y en las propiedades ácido-base de las biomoléculas, mientras la cromatografía de exclusión molecular separa muestras con base en su peso molecular.

En la cromatografía de exclusión molecular, la mezcla de proteínas disueltas en un tampón apropiado se deja fluir por gravedad a lo largo de una columna empaquetada con gránulos, o perlas de un material polimérico inerte, de elevado grado de hidratación, que ha sido previamente lavado y equilibrado con el tampón. Los materiales corrientes para el llenado de las columnas son geles dextranos con enlaces cruzados (Sephadex), agarosa (Sephacosa, Bio-Gel A, Sagavac), poliacrilamida (Bio-Gel P),

poliacrililormofina (Enzocryl Gel) y poliestirenos (Bio-Beads S); los cuales pueden estar preparados con diferentes grados de porosidad interna o determinados intervalos de diámetro.

En las columnas, las proteínas de diferentes tamaño molecular van penetrando los poros del gel en grados diferentes de intensidad y descendiendo a lo largo de la columna a velocidades distintas. Las moléculas de proteína con diámetro mayor que el de los poros de las partículas del gel, no pueden penetrar en estos, por lo cual se dice que son excluidas totalmente por el gel y permanecen por ello en el volumen de exclusión de la columna, definido como el volumen de la fase acuosa en el exterior de los gránulos. Por otra parte, las proteínas muy pequeñas pueden penetrar libremente en las partículas del gel. Las proteínas pequeñas encuentran obstaculizado su paso a través de la columna, mientras que las proteínas de gran tamaño la atraviesan con rapidez, ya que no pueden penetrar en las partículas polímeras hidratadas.

Las proteínas de tamaños intermedios resultarán excluidas de las partículas en un grado que dependerá de sus dimensiones; de aquí que se haya introducido el término de Cromatografía de Exclusión.

El método de filtración en gel es el más conveniente para estimar el peso molecular de una proteína. No requiere una proteína pura y homogénea (Scopes, 1986), todo lo que se necesita es un método de detección de la proteína al salir de la columna.

La cromatografía de exclusión molecular puede utilizarse también

para separar mezclas de otras clases de macromoléculas, así como bioestructuras muy grandes, por ejemplo, virus, ribosomas, núcleos celulares o incluso bacterias, simplemente utilizando resinas o gels con diferentes grados de porosidad interna.

El proceso de filtración en gel se ilustra en la siguiente figura 12.

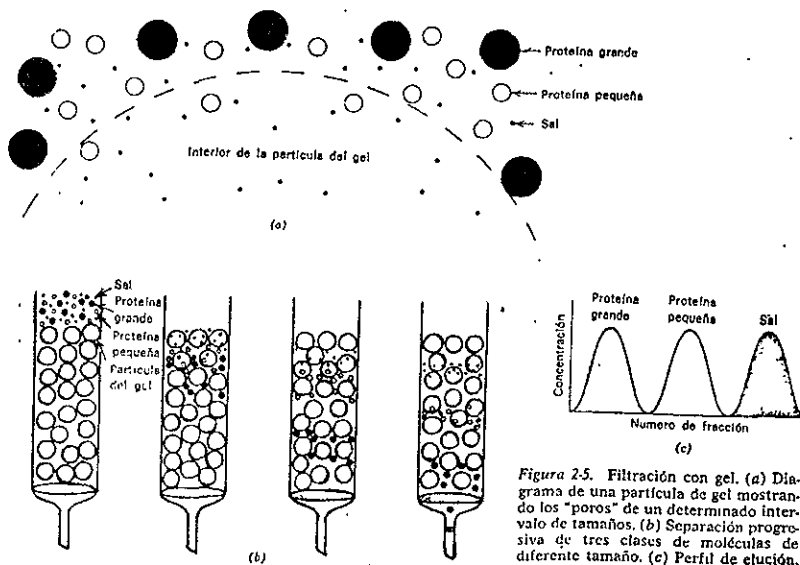


Figura 2.5. Filtración con gel. (a) Diagrama de una partícula de gel mostrando los "poros" de un determinado intervalo de tamaños. (b) Separación progresiva de tres clases de moléculas de diferente tamaño. (c) Perfil de elución.

(Segel, 1982) Figura 12.

1.5.2 Caracterización de proteínas

Por otro lado la identificación de proteínas puede realizarse mediante la identificación y cuantificación de los aminoácidos que en ellas se encuentran; para ello, existe entre otros un equipo llamado autoanizador

de aminoácidos.

El autoanalizador de aminoácidos se basa, entre otros métodos, en la cromatografía de intercambio iónico. Antes de aplicar una muestra, es necesario llevar a cabo una hidrólisis.

Los enlaces peptídicos se hidrolizan con facilidad por calentamiento, y acción de un ácido o una base. El calentamiento de los polipéptidos con exceso de ácido clorhídrico 6N entre 100 y 120°C durante 10 a 24 horas normalmente en un tubo cerrado a vacío, constituye el procedimiento más frecuente para efectuar la hidrólisis completa. En estas condiciones apenas se produce la racemización de los aminoácidos. Sin embargo, no todos los aminoácidos pueden recuperarse cuantitativamente después de una hidrólisis ácida, el triptofano generalmente se destruye por este tratamiento, el cual provoca también la pérdida parcial de serina y treonina (Lehninger, 1977); además, los grupos amida de la asparragina y de la glutamina experimentan hidrólisis completa transformándose en ácidos, aspártico y glutámico respectivamente, además de iones amonio libres.

Los polipéptidos pueden hidrolizarse también por ebullición con disoluciones concentradas de hidróxido de sodio, (hidrólisis alcalina), aunque provoca la destrucción de la cisteína, la serina, la treonina y la racemización de todos los aminoácidos. La hidrólisis alcalina se utiliza normalmente, solo para la valoración por separado del triptofano, que es inestable frente a los ácidos, pero estable en presencia de las bases.

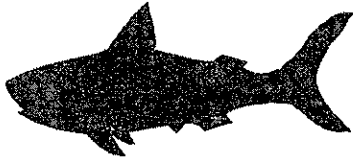
Una vez hidrolizada la muestra, se introduce mediante un sistema de

inyección y de bombeo a una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida. El sistema se realiza bombeando un tampón a través de la columna, cuyo pH y fuerza iónica se aumentan gradualmente, permitiendo que tampones de diferente fuerza iónica y pH se mezclen en una cámara de gradiente especial eluyendo primero los aminoácidos ácidos seguidos de los neutros y por último los básicos.

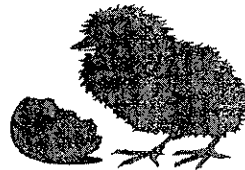
El eluyente de la columna se mezcla con el reactivo ninhidrina, introduciendo también nitrógeno mediante un burbujeo regular para evitar un excesivo mezclado de los compuestos eluidos. Posteriormente, se calienta la mezcla en un baño de aceite para desarrollar el color, se hace pasar por un serpentín de refrigeración y después por un detector ajustado a 570 nm para medir el color azul producido por la reacción del grupo amino libre de los aminoácidos con la ninhidrina. Los aminoácidos prolina e hidroxiprolina no poseen un grupo amino libre por lo cual dan un color amarillo al reaccionar con la ninhidrina, que se detecta a 440 nm.

Muchos de los sistemas usan dos columnas, la segunda contiene una resina de intercambio aniónico básica para separar a los aminoácidos básicos y el amoniaco.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA



CAPITULO II
MATERIALES Y METODOS



MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo se dividió en tres etapas:

En la primera etapa se realizaron pruebas en el proceso de curtido Xipe, variando las concentraciones de hidróxido de sodio con el fin de conocer la concentración óptima, que permitiera obtener el mayor contenido de componentes de la piel, tales como colágeno, elastina y proteoglicanos principalmente. En esta etapa se realizó un análisis fisicoquímico de todos los residuos obtenidos al curtir pollo y cazón.

Una vez conociendo la concentración óptima de hidróxido de sodio a utilizar para realizar el curtido, se procedió a llevar a cabo la segunda etapa; donde se realizó la purificación de proteínas utilizando cromatografía de exclusión molecular.

Finalmente en la tercera etapa se llevó a cabo la identificación de las fracciones obtenidas en la etapa anterior, utilizando el análisis de aminoácidos.

2.1 PRIMERA ETAPA.

2.1.1 *Curtido de las pieles.*

Se utilizaron pieles de cazón y de patas de pollo. Ambas pieles fueron conseguidas en la Central de Abasto.

Para obtener cueros de buena calidad, fue necesario emplear pieles frescas, es decir que no hayan sido refrigeradas demasiado tiempo; esto con el fin de evitar la degradación proteolítica de la piel.

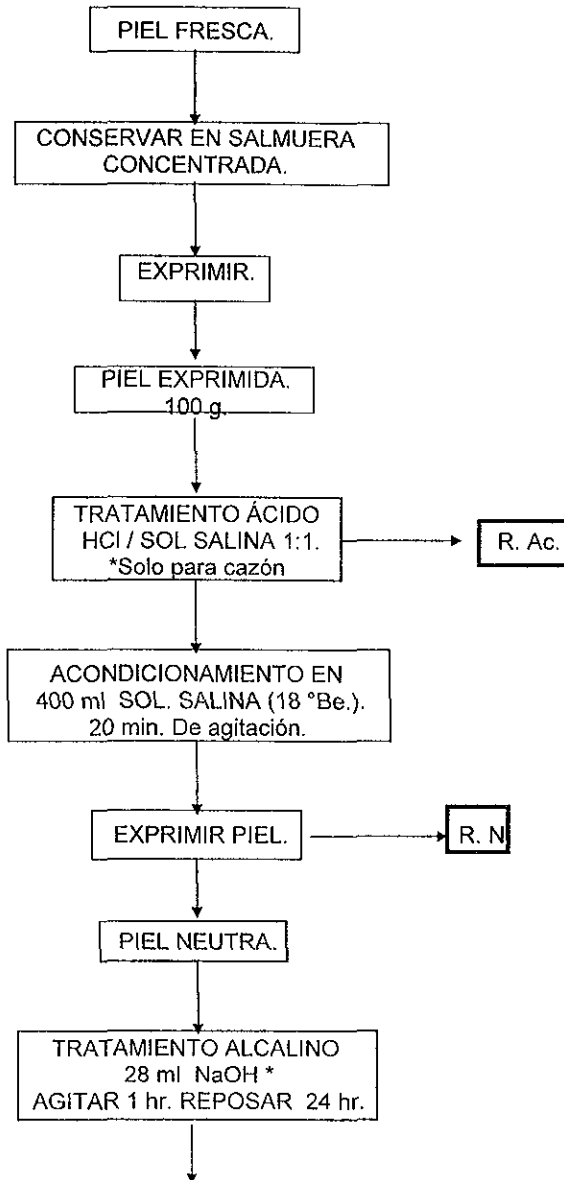
El curtido de las pieles se realizó utilizando el proceso Xipe, manteniendo constantes todos los parámetros a excepción de la concentración de hidróxido de sodio, como se muestra en el diagrama 4.

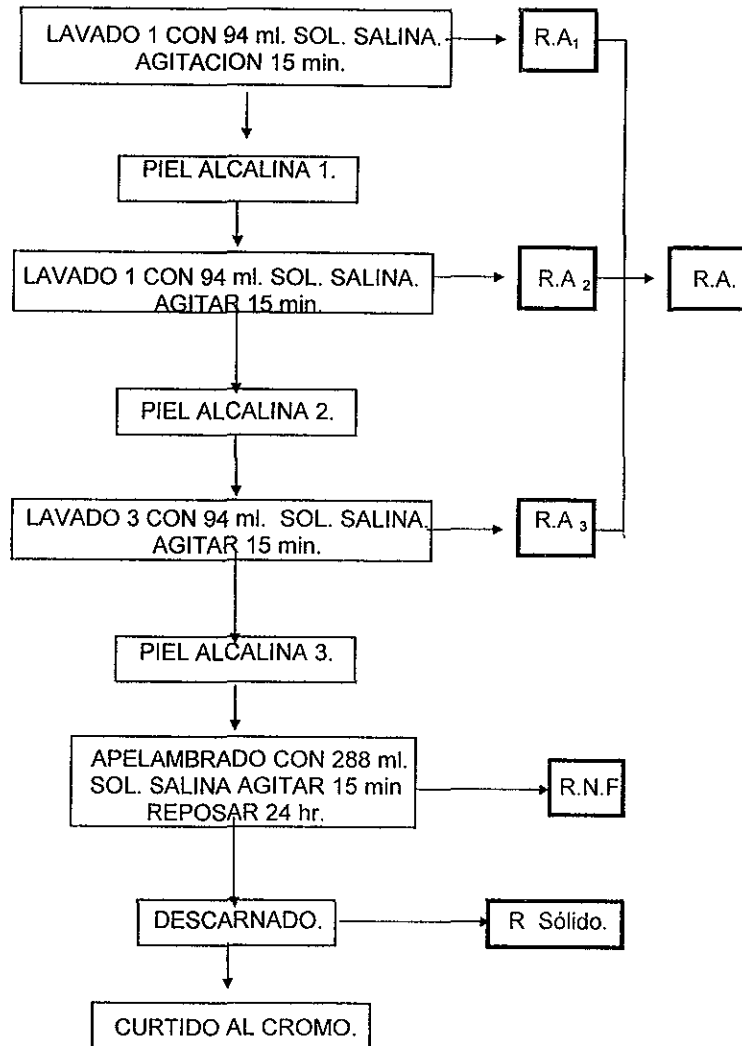
Las concentraciones utilizadas se muestran en la tabla 19

Piel de pollo	14° Be.	18 °Be.	20° Be.
Piel de cazón	18° Be.	20 °Be.	22 °Be.

Tabla 19

DIAGRAMA DE CURTIDO. PROCESO XIPE.
PARA 100 g DE PIEL.





* Concentración de NaOH 14 °Be., 18 °Be., 20 °Be., 22 °Be.

R. Ac. (Residuo Ácido)

R.N (Residuo Neutro).

R.A (Residuos Alcalinos).

R.N.F. (Residuo Neutro Final).

Diagrama 4

Al variar la concentración de hidróxido de sodio se pretende tener diferentes condiciones en las cuales se extraen los componentes de la piel.

De esta manera, mediante el curtido de las pieles y utilizando el proceso Xipe, se lograron obtener residuos neutros y alcalinos con los que se continuó el trabajo. Los residuos obtenidos se presentan en la tabla 20:

PIEL DE PATAS DE POLLO	PIEL DE CAZÓN
	Residuo Ácido.
Residuo Neutro.	Residuo Neutro.
Residuos Alcalinos (1,2,3).	Residuos Alcalinos (1,2,3).
Residuos Neutro Final.	Residuo Neutro Final.

Tabla 20

2.1.2 Análisis fisicoquímico de los residuos.

Una vez obtenidos los residuos, se procedió a realizar un análisis fisicoquímico a los mismos. Estas determinaciones se hicieron con el fin de conocer la cantidad de cenizas, proteína, carbohidratos, sólidos y grasa presentes en los residuos, de esta manera se logró saber bajo que concentración de hidróxido de sodio (en el curtido) se obtiene la mayor cantidad de proteína y carbohidratos para poder seleccionarlos y posteriormente trabajar con ellos.

Previo al análisis de los residuos fue necesario realizar una diálisis, esto con el fin de eliminar la alta cantidad de cloruro de sodio presente. Una vez dializados, se realizaron las siguientes determinaciones:

1. Determinación de sólidos totales (Mondragón, 1989. Secado en estufa).
2. Determinación de Proteína Total (A.O.A.C., 1990. Método 954.01).
3. Determinación de Proteína Soluble (Mondragón, 1989. Método de Lowry).
4. Determinación de Cenizas (A.O.A.C., 1990. Método 930.04).
5. Determinación de Carbohidratos Totales (Por diferencia).
6. Determinación de Carbohidratos Solubles (Southgate, 1990. Método Fenol-Sulfúrico).
7. Determinación de Grasa (Mondragón, 1989. Extracción en frío con éter etílico).

2.2 SEGUNDA ETAPA.

2.2.1 Selección de los residuos.

.Se decidió trabajar con los residuos alcalinos curtidos a la concentración de NaOH de 20° Be.y adicionalmente con los residuos ácidos, ya que bajo estas condiciones se encuentran solubilizados la mayor cantidad de los componentes de la piel, lo cual no sucede con las otras concentraciones de álcali utilizadas.

2.2.2 Cromatografía de exclusión molecular.

Con el fin de purificar las proteínas presentes en los residuos (alcalinos y ácido), se utilizó la cromatografía de exclusión molecular, para separar las proteínas presentes y de interés como por ejemplo colágeno y elastina.

Para poder realizar la cromatografía de exclusión molecular, fue necesario establecer ciertas condiciones bajo las cuales finalmente se trabajó.

Se utilizó una columna conteniendo un gel semirígido (FRACTOGEL TSK HW-55(F)) que consiste en polímeros de vinil hidrofílicos y cuyas características se indican en la tabla 21.

FRACTOGEL TSK	TAMAÑO DE PARTÍCULA (mm)	PARA PROTEÍNAS (g/mol)
HW-55(F)	0.32 - 0.063	1,000 - 1.100,000

Biochromatography. MERCK

Tabla 21

Las proteínas más importantes para el estudio son el colágeno y la elastina, de esta manera puede justificarse el rango de peso molecular que se maneja para la columna (tabla 22).

PROTEÍNA	PESO MOLECULAR (Da.)
Colágeno	340,000
Elastina	68,000 - 84,000

Tabla 22

Las concentraciones de sulfato de amonio que se utilizaron para precipitar las muestras se indican en la tabla 23.

CONCENTRACION DE $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ PARA PRECIPITAR.	
RESIDUOS DE POLLO	RESIDUOS DE CAZON
30 %	30 %
40 %	40 %
----	50 %
----	60 %

Tabla 23

El diagrama 5 muestra el tratamiento que se dio a los residuos seleccionados (Alcalinos y ácido curtidos con NaOH a 20° Be.), con el fin de separar las proteínas ahí presentes.

CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR.

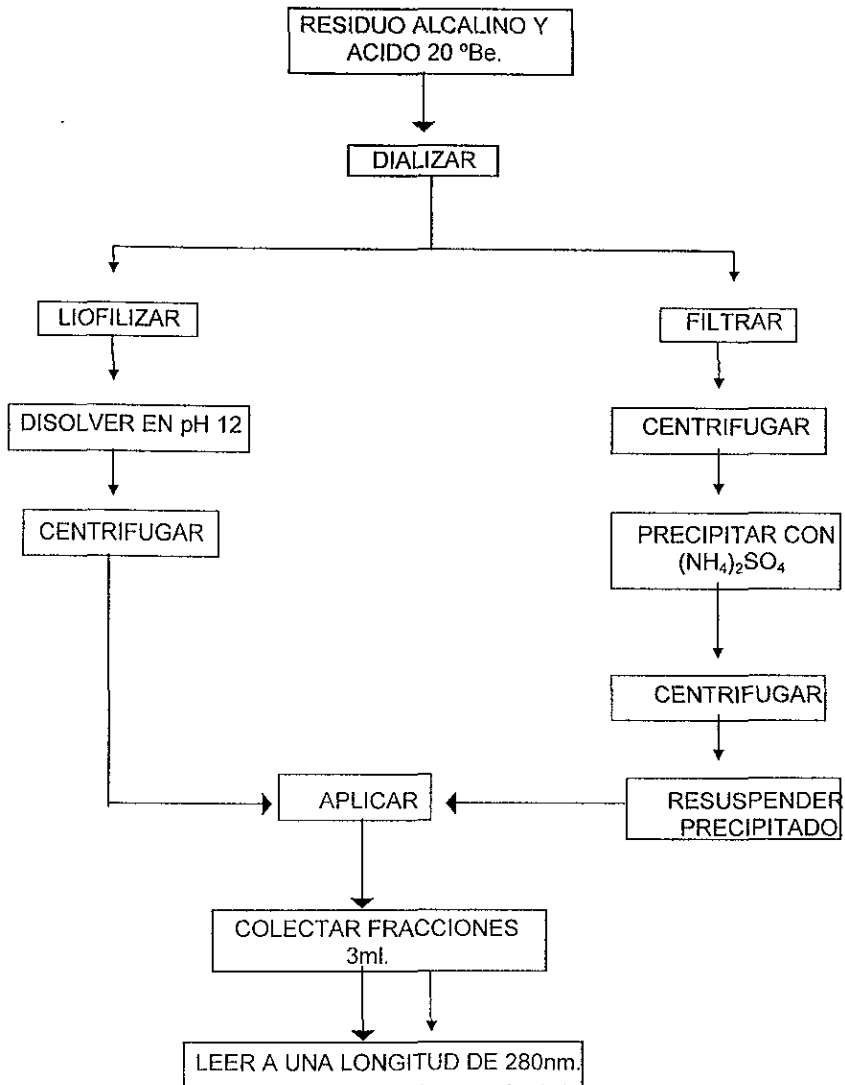


Diagrama 5

Las condiciones de trabajo que se utilizaron en la purificación de las proteínas por el método de cromatografía de exclusión molecular se presentan a continuación en la tabla 24.

CONDICIONES	
Fase estacionaria.	Gel TSK HW-55(F) (MERCK)
Dimensiones de la columna.	30 x 2.6 cm
Flujo.	1 ml./min.
Buffer.	Boratos pH 12.
Concentración de la muestra.	0.2 %
Inyección.	0.5 ml.
Recolección.	3 ml.
Detección.	Absorción 280 nm. Espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 3B.

Tabla 24

Para la calibración de la columna se emplearon algunos estándares que se presentan en la tabla 25.

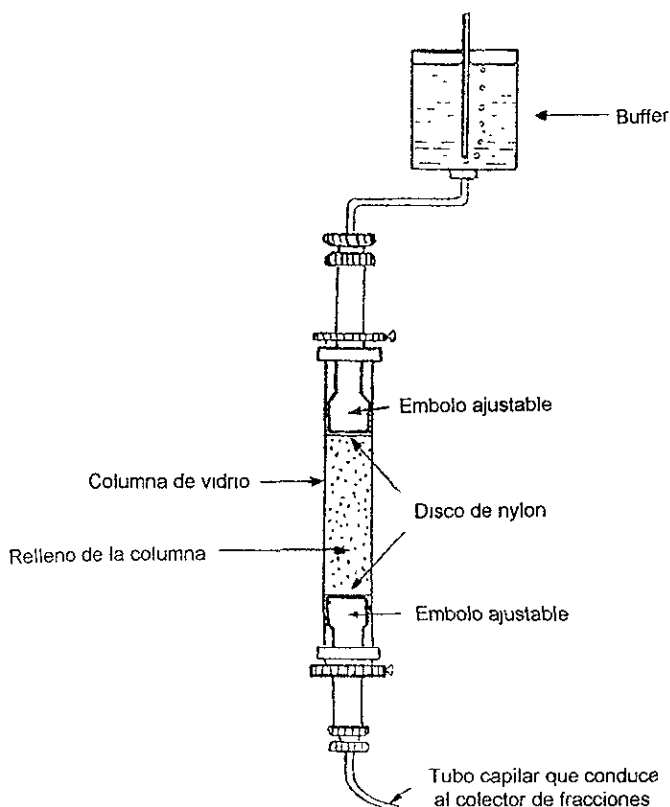
CALIBRACION DE LA COLUMNA.
Azul de dextrana (Volumen muerto). SIGMA
Estándar (P.M. 1,350 - 670,000). BIO RAD*
Estándar de Grenetina. KNOX

Tabla 25

* El estándar de intervalo de Peso molecular 1,350 - 670,000 se encuentra compuesto de las proteínas indicadas en la tabla 26.

PROTEINA	PESO MOLECULAR (Da.)
Vit. B12	1,350
Mioglobina	17,000
Ovoalbumina	44,000
Albumina	68,000
Globulina	158,000
Tiroglobulina	670,000

Tabla 26



Equipo para Cromatografía de exclusión molecular
Figura 13

2.3 TERCERA ETAPA.

2.3.1 Análisis de proteínas.

En esta última etapa se trabajó con las fracciones que presentaron mayor absorbancia a 280 nm, (indicativo de la presencia de proteína). Estas fracciones se analizaron de la siguiente manera:

Una vez purificada la muestra mediante cromatografía de exclusión molecular, se dializó con el fin de eliminar las sales presentes debido a que las proteínas se encuentran disueltas en un amortiguador de boratos.

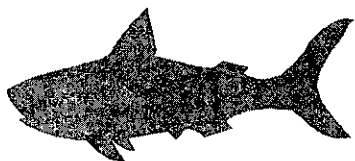
A continuación en las tablas 27 y 28 se mencionan las especificaciones para esta etapa en particular.

ESPECIFICACIONES	
DIALISIS	
Material.	Membranas de celulosa. SIGMA.
Retención.	Proteínas de PM mayor a 12,000 Da.
Dimensiones de la membrana.	21 mm de diámetro.
Tiempo de diálisis.	24 horas.
LIOFILIZACION	
Equipo.	Liofilizadora LABCONCO Freeze dry-3.
Tiempo de liofilización.	24 horas.

Tabla 27

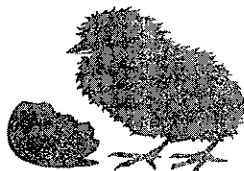
ESPECIFICACIONES	
HIDROLISIS	
Equipo.	Pico Tag Work Station. WATERS.
Reactivos.	HCl 6M, N ₂
Temperatura.	120 °C.
Tiempo de hidrólisis.	24 horas.
ANALISIS DE AMINOACIDOS	
Equipo.	Autoanalizador de aminoácidos Beckman 6300.
Reactivos.	Ninhidrina Nin - RX Beckman. Buffer Na-D, Na-E, Na-F, Na-S.
Columna.	De sodio de alta resolución (intercambio iónico) Beckman.
Dimensiones de la columna.	12 cm largo x 4 mm D.I
Tamaño de partícula.	7.5 µm.
Flujo.	21 ml./hr.
Estándar de aminoácidos.	100 nmol/ml Beckman.
Estándar prolina - hidroxiprolina	1.25 µg/ml SIGMA.
Estándar de grenetina.	8µg/100µl KNOX.
Inyección.	50 µl.
Detector.	Absorción 570 y 440 nm.
Tiempo de análisis.	80 minutos por muestra.

Tabla 28



CAPITULO III

RESULTADOS Y ANALISIS



RESULTADOS Y ANALISIS

3.1 PRIMERA ETAPA.

Como se mencionó en la metodología, la primera etapa consistió en variar las condiciones alcalinas durante el proceso de curtido. Para la piel de patas de pollo se emplearon concentraciones de 14, 18 y 20° Be para establecer concentración de álcali óptima para obtener el mayor rendimiento de proteína. Se realizaron análisis fisicoquímicos de los residuos neutros, alcalinos y neutros finales. En la tabla 29 se muestran los resultados para el residuo neutro, que son obtenidos antes del tratamiento con álcali.

ANALISIS COMPOSICIONAL DEL RESIDUO NEUTRO DEL CURTIDO
DE PATAS DE POLLO.

ANALISIS	RESIDUO NEUTRO
	g/100 g de sólidos totales
Cenizas.	78.43
Proteína Soluble.	0.042
Proteína Insoluble.	1.05
Proteína Total.	1.10
Grasa.	5.40
Carbohidratos Solubles.	0.016
Carbohidratos Insolubles.	15.07
Carbohidratos Totales. (diferencia)	15.086

Por ciento en base seca
Sólidos totales 28.22 %

Tabla 29

Las condiciones que establece el proceso Xipe son de hidróxido de sodio y solución salina a 18° Be. Estas condiciones se sabe de antemano, son las más adecuadas para la obtención de un cuero de buena calidad, aunque es importante mencionar que las concentraciones pueden variarse dependiendo del tipo de piel que se desee curtir, o bien de los recursos con los cuales se cuenta. Para los fines de este trabajo, las condiciones alcalinas fueron modificadas con el fin de obtener la mayor proporción de proteína en los residuos sin dañar los cueros a obtener. En la composición de los residuos neutros destaca la elevada proporción de cenizas (78.43%), debido al empleo de soluciones salinas por lo que la proporción de los otros componentes se ve disminuida.

A continuación, en la tabla 30 se muestran los resultados del análisis fisicoquímico realizado a los residuos alcalinos obtenidos para el curtido de pollo variando las concentraciones de álcali (14, 18 y 20° Be.).

ANÁLISIS COMPOSICIONAL DE LOS RESIDUOS ALCALINOS DEL CURTIDO DE PATAS DE POLLO.

ANÁLISIS	RESIDUOS ALCALINOS g/100 g de sólidos totales		
	14° Be.	18° Be.	20° Be.
Cenizas.	54.20	53.41	45.57
Proteína Soluble.	2.81	2.93	3.56
Proteína Insoluble.	4.54	5.83	5.83
Proteína Total.	7.35	8.76	9.39
Grasa.	15.56	31.04	27.31
Carbohidratos Solubles.	0.01	0.04	0.03
Carbohidratos Insolubles.	20.85	8.20	18.36
Carbohidratos Totales.	20.86	8.24	18.39

Por ciento en base seca.

Sólidos totales 26.09 % (14 ° Be), 24.90 % (18 ° Be), 29.95 % (20 ° Be)

Tabla 30

Mediante el análisis de los residuos alcalinos, se observa que al modificar la concentración de NaOH se manifiesta una diferencia en la composición de los residuos, estos resultados son consecuencia de la acción del NaOH. El álcali actúa solubilizando las proteínas de la piel, de tal manera que a mayor concentración de NaOH se obtuvo una mayor cantidad de proteína total. Así se tiene que a 14° Be. la cantidad de proteína es de 7.35%, a 18° Be es de 8.76% y a 20° Be. es de 9.39%.

Finalmente para el caso del curtido de patas de pollo se tienen los residuos neutros finales (tabla 31), los cuales se obtuvieron al realizar el apelmbrado en el proceso de curtido (Diagrama 4). La composición de los residuos neutros finales se presenta a continuación.

**ANALISIS COMPOSICIONAL DEL RESIDUO NEUTRO FINAL DEL CURTIDO
DE PATAS DE POLLO**

ANALISIS	RESIDUO NEUTRO FINAL g/100 g de sólidos totales		
	14° Be.	18° Be.	20° Be.
Cenizas.	85.47	89.81	85.19
Proteína Soluble.	1.04	1.00	1.13
Proteína Insoluble.	0.53	0.93	0.44
Proteína Total.	1.57	1.93	1.57
Grasa.	3.98	4.25	5.00
Carbohidratos Solubles.	0.01	0.02	0.015
Carbohidratos Insolubles.	8.98	4.01	8.24
Carbohidratos Totales.	8.99	4.03	8.255

Porcentaje base seca

Sólidos totales 26.09 % (14° Be), 25.91 % (18° Be), 26.41 % (20° Be).

Tabla 31

En los residuos neutros finales la cantidad de proteína total es menor comparada con la de los residuos alcalinos, ya que estos últimos presentan las condiciones adecuadas de solubilidad de las proteínas de la piel y es ahí donde se lleva a cabo la mayor extracción de proteína. Por otro lado los residuos neutros finales están conformados por el remanente de los alcalinos y solución salina donde la extracción de proteínas de la piel no se lleva a cabo y se observa una cantidad de proteína aproximadamente constante para las diferentes variaciones de NaOH.

También destaca el hecho, de que la cantidad de grasa presente en los residuos neutros finales es menor comparada con la cantidad de grasa contenida en los residuos alcalinos, ya que el carácter hidrofílico de las soluciones salinas no permite la extracción de grasa.

Para el curtido de la piel de cazón se utilizaron concentraciones de 18, 20 y 22° Be. Es importante mencionar que la piel obtenida a 22° Be resultó dañada por lo que ésta concentración fue descartada. De manera adicional para esta piel se incluyó como primer paso un tratamiento ácido (Diagrama 4) con la finalidad de eliminar la dentina presente en la superficie de la piel de cazón. El análisis fisicoquímico se realizó para los residuos ácidos, neutros, alcalinos y neutros finales obtenidos al curtir solo a 18 y 20° Be. de NaOH (tablas 32, 33, 34 y 35).

**ANÁLISIS COMPOSICIONAL DEL RESIDUO ACIDO
DEL CURTIDO DE CAZON.**

ANÁLISIS	RESIDUO ACIDO
	g/100 g de sólidos totales
Genizas.	52.49
Proteína Soluble.	3.60
Proteína Insoluble.	7.44
Proteína Total.	11.14
Grasa.	2.71
Carbohidratos Solubles.	0.18
Carbohidratos Insolubles.	33.47
Carbohidratos Totales.	33.65

Por ciento base seca

Sólidos totales 10.20 % (18, 20 ° Be).

Tabla 32

En la tabla 32 se observa que la composición entre dichos residuos no presentó variaciones pues este residuo se obtiene previo al tratamiento alcalino y al igual que en los residuos neutros de pollo, dichas concentraciones no afectan la composición de los mismos, es por ello que en esta tabla se presenta un solo resultado para los dos tratamientos utilizados. La proporción de cenizas es elevada debido al empleo de una mezcla ácido clorhídrico - solución salina. Bajo estas condiciones (ácidas) se lleva a cabo la solubilización de las proteínas de la piel (como colágeno), por lo que este residuo resulta de interés para su análisis posterior.

Una vez realizado el tratamiento ácido, los pasos posteriores se llevan a cabo de igual forma que en el curtido de las patas de pollo (Diagrama 4),

por lo que siguiendo el mismo esquema, la tabla 33 presenta los resultados del análisis realizado a los residuos neutros obtenidos del curtido de la piel de cazón.

**ANALISIS COMPOSICIONAL DEL RESIDUO NEUTRO
DEL CURTIDO DE CAZON.**

ANALISIS	RESIDUO NEUTRO
	g/100 g de sólidos totales
Cenizas.	66.49
Proteína Soluble.	0.74
Proteína Insoluble.	0.85
Proteína Total.	1.59
Grasa.	1.38
Carbohidratos Solubles.	0.031
Carbohidratos Insolubles.	30.49
Carbohidratos Totales.	30.52

Por ciento base seca.

Sólidos totales 16.44 % (18, 20 ° Be).

Tabla 33

En este caso se observa un porcentaje más elevado de cenizas que en los residuos ácidos ocasionado por el uso exclusivo de soluciones salinas. Así mismo, el porcentaje de proteína disminuye para este residuo porque al utilizar solo la solución salina, la solubilización de proteínas se limita a las de tipo globular.

Siguiendo con el esquema de curtido, para este caso también se obtuvieron tres fracciones de residuos alcalinos que se manejaron como uno solo la tabla 34 muestra los resultados del análisis fisicoquímico realizado, variando la concentración de álcali (18 y 20° Be.)

**ANALISIS COMPOSICIONAL DE LOS RESIDUOS ALCALINOS
DEL CURTIDO DE CAZON**

ANALISIS	RESIDUOS ALCALINOS g/100 g de sólidos totales	
	18° Be.	20° Be.
Cenizas.	65.20	66.65
Proteína Soluble.	0.78	3.46
Proteína Insoluble.	3.78	8.22
Proteína Total.	4.76	8.93
Grasa.	3.30	3.42
Carbohidratos Solubles.	0.005	0.103
Carbohidratos Insolubles.	26.72	20.88
Carbohidratos Totales.	26.72	20.98
Sólidos Totales.	19.27	20.56

Por ciento base seca.

Sólidos totales 19.27% (18° Be.), 20.56% (20° Be.)

Tabla 34

Los resultados de los residuos alcalinos presentan un comportamiento semejante frente a la acción del NaOH, que los residuos alcalinos obtenidos del curtido de patas de pollo; es decir, un aumento en la concentración de NaOH provoca un aumento en el porcentaje de proteína total, así se tiene que a 18° Be. la cantidad de proteína es de 4.76% y a 20° Be es de 8.93%.

Por último en la tabla 35 se presentan los resultados de la caracterización realizada a los residuos neutros finales con cada concentración de NaOH.

**ANALISIS COMPOSICIONAL DEL RESIDUO NEUTRO FINAL
DEL CURTIDO DE CAZON**

ANALISIS	RESIDUO NEUTRO FINAL	
	g/100 g de sólidos	
totales	18° Be.	20° Be.
Cenizas.	59.00	51.92
Proteína Soluble.	0.017	1.21
Proteína Insoluble.	3.018	3.37
Proteína Total.	3.03	4.58
Grasa.	1.21	1.24
Carbohidratos Solubles.	0.032	0.172
Carbohidratos Insolubles.	36.71	42.07
Carbohidratos Totales.	36.74	42.24

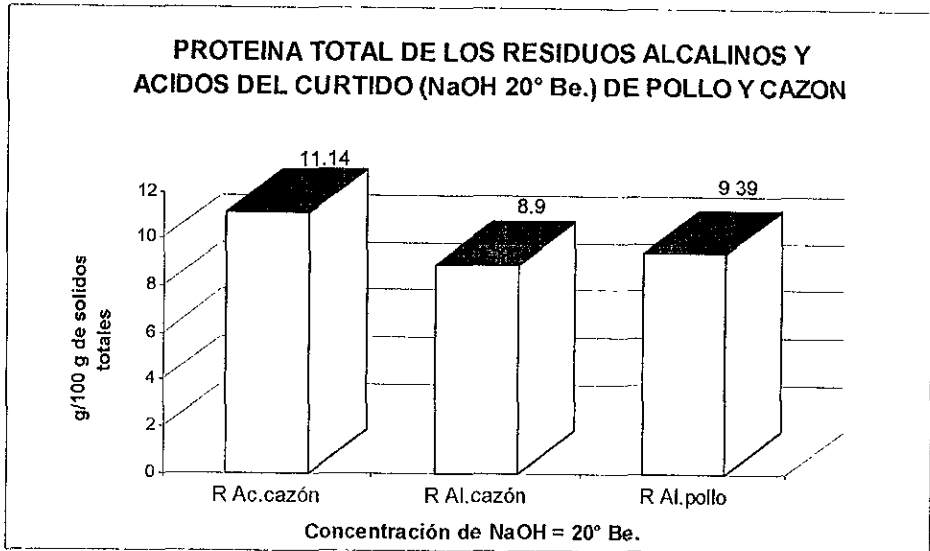
Por ciento base seca.

Sólidos totales 14.41% (18° Be), 13.35% (20° Be).

Tabla 35

Al igual que para el curtido de patas de pollo, estos residuos están constituidos por remanente de los residuos alcalinos y solución salina, es por eso que a simple vista la composición entre los tratamientos no presenta variaciones, observando que la mayor cantidad de proteína total se presenta en el residuo obtenido al curtir a 20° Be.

Con el fin de simplificar los resultados anteriores, a continuación se presenta la gráfica 1 donde se muestran solo las variaciones de proteína total en los residuos del curtido para la piel de patas de pollo y para la piel de cazón, debido a que uno de los fines de la presente investigación consiste en el análisis de la fracción proteínica.



Gráfica 1

De los resultados que se muestran en la gráfica 1 se desprende que, los residuos que presentan la mayor cantidad de proteína son los residuos alcalinos para las tres concentraciones de álcali utilizadas.

El aumento en la cantidad de proteína de los residuos alcalinos, comparado con los residuos neutros y los residuos neutros finales, es consecuencia de la acción solubilizante que ejerce el NaOH sobre la proteínas de la piel, de tal manera que se espera estos residuos se encuentren constituidos en su mayoría por proteínas fibrilares (probablemente colágeno, elastina, etc.).

Por otro lado, la fracción proteínica de los residuos neutros se considera que está constituida principalmente por proteínas globulares solubilizadas por las soluciones salinas utilizadas, de tal manera que este residuo no resulta de interés para la presente investigación.

Por último, los residuos neutros finales presentan una fracción proteínica probablemente constituida por proteínas de tipo fibrilar, ya que contienen el remanente de los residuos alcalinos; sin embargo la fracción proteínica en este residuos se encuentra diluida por lo que no resulta de interés.

Así mismo se observa que al curtir la piel de cazón a 20° Be., los residuos que presentan la mayor cantidad de proteína son los residuos ácidos y alcalinos con 11.14% y 8.93% respectivamente de tal manera que para la presente investigación estos son los residuos de interés. Esta proporción en la cantidad de proteína de los residuos ácidos y alcalinos es consecuencia de las condiciones que se utilizan, las cuales permiten solubilizar las proteínas fibrilares de la piel, mientras que en los residuos neutros, el uso exclusivo de soluciones salinas solo permite la solubilización de proteínas globulares, en los residuos neutros finales también se observa una menor cantidad de proteína, que probablemente son proteínas fibrilares remanentes de los residuos alcalinos, diluidas en solución salina.

Resumiendo, se observa la presencia de proteína en todos los residuos, sin embargo los residuos útiles para llevar a cabo este trabajo son los residuos alcalinos para las patas de pollo y los residuos ácidos y alcalinos para la piel de cazón, obtenidos todos del curtido a 20° Be., ya que las proteínas de interés son de tipo fibrilar como el colágeno y la elastina, proteínas solubles únicamente en estas condiciones. Siendo la concentración de NaOH de 20° Be. en la que se presentan en mayor cantidad, además de que las pieles obtenidas no presentan daño alguno. A concentraciones mayores de NaOH parte del tejido de la piel se rompe solubilizándose en los residuos, con lo que aumenta la cantidad de proteína; sin embargo la piel resulta dañada y por lo tanto no comercializable, no cumpliéndose con los objetivos planteados en el curtido.

En cuanto a los carbohidratos solubles, como los proteoglicanos, en todos los residuos se presentan en cantidades mínimas, 0.01-0.04% para los residuos obtenidos del curtido de patas de pollo y 0.05-0.17% para los obtenidos del curtido de la piel de cazón, por lo que no se abundó sobre su investigación. Por último en relación a la cantidad de grasa presente en los residuos, se observa una mayor cantidad en los residuos del curtido de patas de pollo (31.04%) que en los de cazón (3.42%), ésta diferencia se debe a que en el pollo la mayor cantidad de grasa se encuentra entre la piel y los músculos (Balarezo, 1998), mientras que en el cazón, que es un pez magro con una proporción de grasa de 4% o menos se encuentra distribuida en el hígado u otros órganos internos (Donoso, 1996); de tal manera que para la presente investigación estos resultados no afectan a la separación de proteínas.

3.2 SEGUNDA ETAPA

Una vez seleccionados los residuos se llevó a cabo la segunda etapa; donde las proteínas presentes se precipitaron con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para posteriormente analizar las fracciones obtenidas por medio de cromatografía de exclusión molecular. Previo al análisis de los residuos se realizó la calibración de la columna cromatográfica utilizando azul de dextrana que tiene un peso molecular de 2,000,000 daltons (anexo, cromatograma 1). La gráfica 1 muestra la curva de calibración en las condiciones establecidas.

El volumen muerto permite saber si la separación cromatográfica se efectúa de manera eficiente, ya que si una proteína eluye con el volumen muerto, indica que no se está llevando a cabo la separación de la muestra.

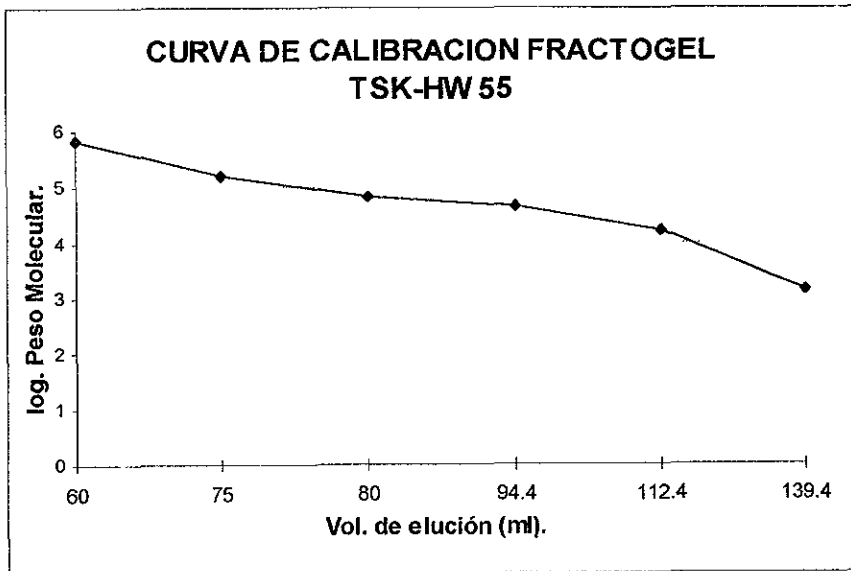
Después de conocer el volumen muerto se calibró la columna utilizando un estándar (BIO-RAD) con proteínas de diferentes pesos moleculares (Cromatograma 2), encontrando los siguientes resultados (tabla 36).

**PROTEINAS UTILIZADAS PARA LA CALIBRACION DE LA COLUMNA
(CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION MOLECULAR).**

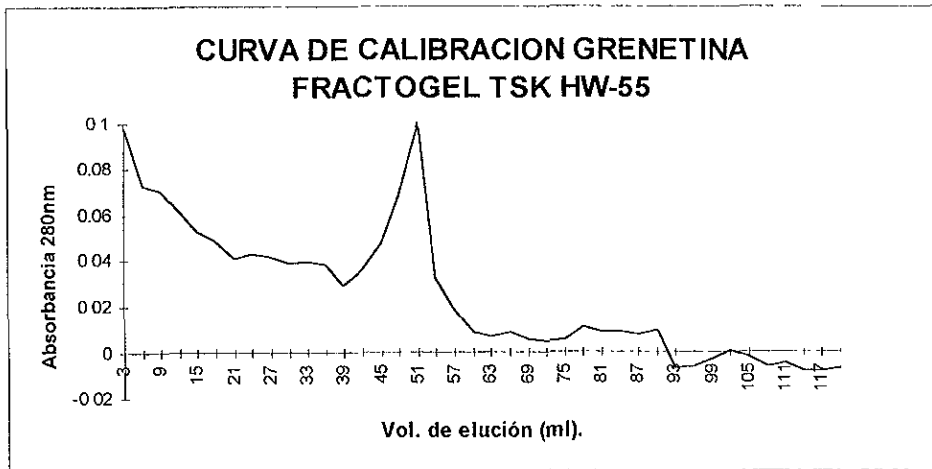
PROTEINA	PESO MOLECULAR	VOL. ELUCIÓN (ml)
Tiroglobulina	670,000	60
Globulina	158,000	75
*Albúmina	68,000	80
Ovoalbúmina	44,000	94.4
Mioglobina	17,000	112.4
Vitamina B ₁₂	1,350	139.4

* La albúmina no se encuentra en el estándar (BIO-RAD), ésta se aplicó de manera independiente y fue adicionado a la curva de calibración. **Tabla 36**

En base a los datos obtenidos de la calibración de la columna se realizó la curva de calibración de la misma.



Las proteínas utilizadas para la calibración de la columna son de tipo globular, mientras que las de interés (colágeno y elastina) son de tipo fibrilar y su comportamiento en la cromatografía de exclusión molecular es diferente, por lo tanto se aplicó un estándar de grenetina (colágeno hidrolizado) para este estándar se obtuvo un volumen de elución de 51.2 mililitros (Cromatograma 3). Al interpolar este valor en la curva de calibración se tiene un peso molecular de **954,992** daltons, mientras que el peso esperado es de aproximadamente 300,000 daltons por lo que las proteínas presentarán pesos moleculares mayores a los esperados.



CROMATOGRAMA 3

Una vez aplicados los estándares correspondientes, se realizó la aplicación de las muestras problema.

SEPARACION CON SULFATO DE AMONIO

Antes de aplicar las muestras se precipitaron con sulfato de amonio para purificarlas más, ya que esta precipitación permite que se tengan conglomerados de proteínas con cierto intervalo de peso molecular; así al aplicar las muestras en la columna de cromatografía de exclusión molecular, será mas fácil aun su purificación por este método.

En la tabla 37 se presenta la cantidad de proteína en las fracciones obtenidas en la precipitación con sulfato de amonio.

PROTEINA OBTENIDA DESPUES DE PRECIPITAR LAS MUESTRAS (CON $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) DEL CURTIDO DE PATAS DE POLLO

% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	PROTEINA (mg/ml)	PROTEINA %
30	10.64	77.68
40	2.86	21.20

Proteína total 13.70mg/ml

Tabla 37

En la tabla 38 se presentan las cantidades de proteína obtenidas al precipitar las fracciones (cazón) con sulfato de amonio.

**PROTEINA OBTENIDA DESPUES DE PRECIPITAR LAS MUESTRAS
(CON $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) DEL CURTIDO DE CAZON.**

% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	PROTEINA (mg/ml)	PROTEINA %
30	1.11	6.40
40	7.14	40.93
50	5.51	31.58
60	2.73	15.64

Proteína total 17.45 mg/ml

TABLA 38

ANALISIS CROMATOGRAFICO

En la tabla 39 se presentan los resultados de las determinaciones cromatográficas realizadas a las fracciones obtenidas de las muestras problema (curtido de las patas de pollo) precipitadas con sulfato de amonio.

**PESOS MOLECULARES OBTENIDOS POR CEM DE LAS FRACCIONES
PRECIPITADAS CON $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ DEL RESIDUO ALCALINO POLLO.**

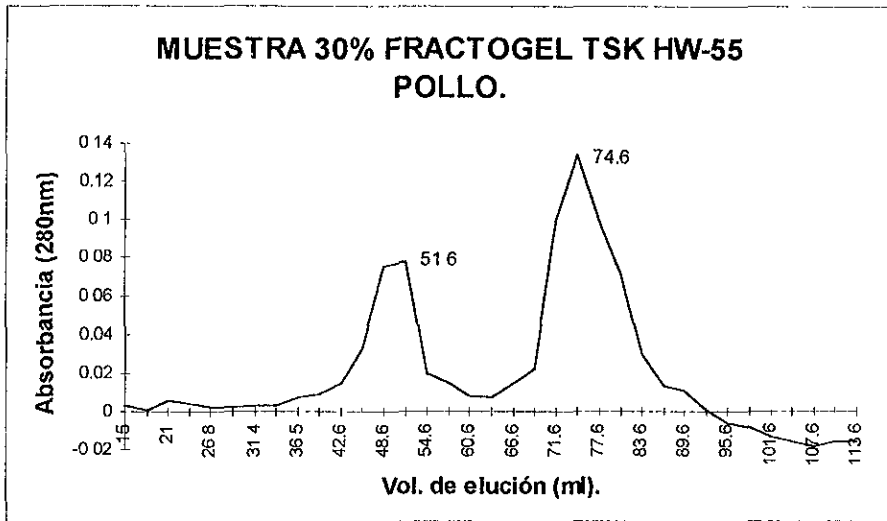
Concentración $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ %	PESOS MOLECULARES (Da)	
	PICO 1	PICO 2
30	933,254	173,780
40	141,253	--

TABLA 39

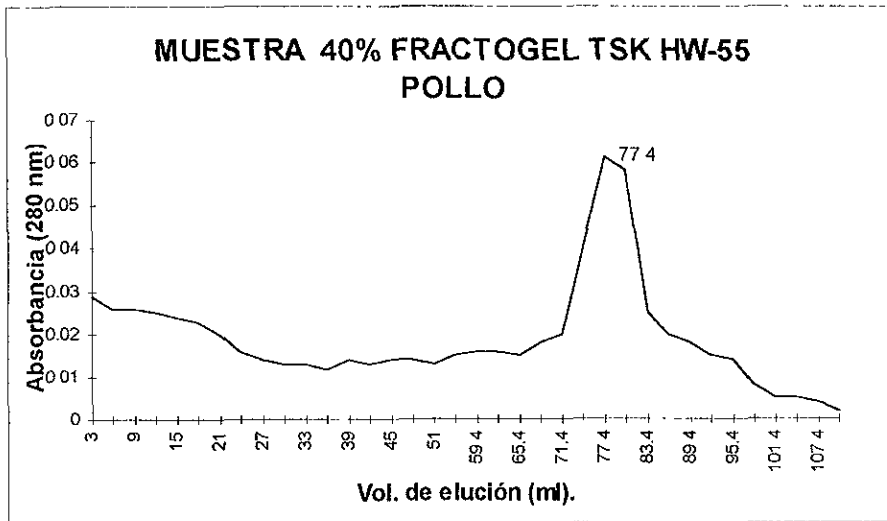
Los resultados de las fracciones analizadas del curtido de patas de pollo, por medio de la cromatografía de exclusión molecular muestran que la fracción precipitada a 30% (sulfato de amonio) con una cantidad de proteína de 10.64 mg/ml, fue separada en dos picos, mientras que la fracción precipitada a 40% solo registro un pico con un volumen de elución menor a los picos registrados a 30% lo cual puede interpretarse como la separación de tres proteínas de diferente peso molecular, siendo necesario el empleo de otras técnicas para corroborar que dichas proteínas sean distintas o que se trata de una misma fraccionada.

En la fracción precipitada a 30% el pico 1 presenta un volumen de elución (51.6 ml) igual al volumen de elución obtenido para el estándar de grenetina (51.2 ml), esta similitud en los resultados muestra que ambas proteínas tienen el mismo peso molecular, sin tratarse necesariamente de la misma proteína

En las tablas 40 y 41 se presentan los resultados de las determinaciones cromatográficas realizadas a las fracciones obtenidas de las muestras problema (curtido de piel de cazón) precipitadas con sulfato de amonio.



Cromatograma 4



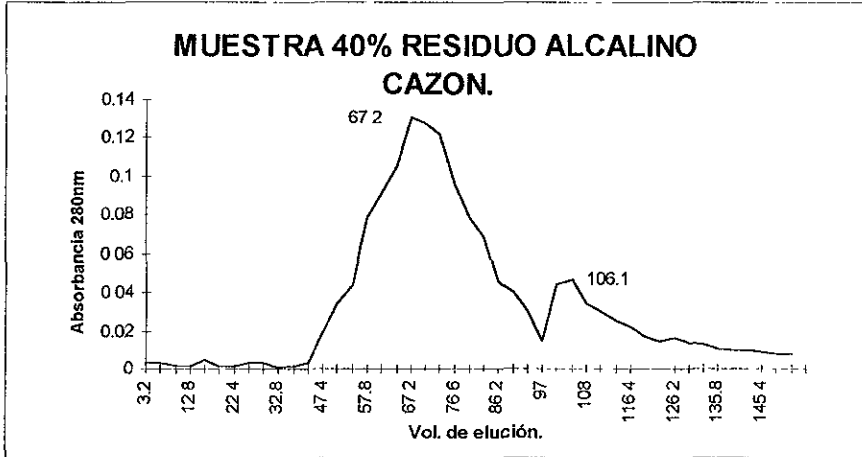
Cromatograma 5

**PESOS MOLECULARES OBTENIDOS POR CEM DE LAS FRACCIONES
PRECIPITADAS CON $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ DEL RESIDUO ALCALINO CAZON.**

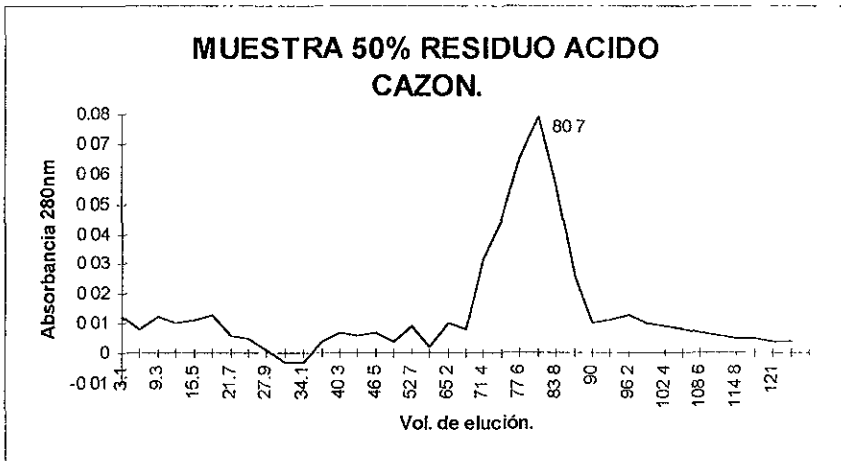
Concentración $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ %	PESOS MOLECULARES (Da)		
	<i>PICO 1</i>	<i>PICO 2</i>	<i>PICO 3</i>
30	575,440	31,622	15,135
40	295,121	17,782	--
50	165,958	--	--
60	56,234	--	--

TABLA 40

Las fracciones analizadas del curtido de piel de cazón (tabla 40), muestran que la fracción precipitada a 30% (sulfato de amonio) con una cantidad de proteína de 1.11 mg/ml, fue separada en tres picos, que van de un volumen de elución de 58.2 hasta 108.1ml correspondiendo a pesos moleculares de 575,440 a 15,135 Da. respectivamente mientras que la última fracción (60% sulfato de amonio) corresponde a un peso molecular de 56,234 Da. con un volumen de elución de 90 ml (cromatogramas 6 y7).



Cromatograma 6



Cromatograma 7

**PESOS MOLECULARES OBTENIDOS POR CEM DE LAS FRACCIONES
PRECIPITADAS CON $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ DEL RESIDUO ACIDO CAZON.**

Concentración $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ %	PESOS MOLECULARES (Da)		
	<i>PICO1</i>	<i>PICO2</i>	<i>PICO 3</i>
30	575,440	208,929	114,815
40	251,188	23,442	--
50	112,201	--	--
60	8,128	--	--

TABLA 41

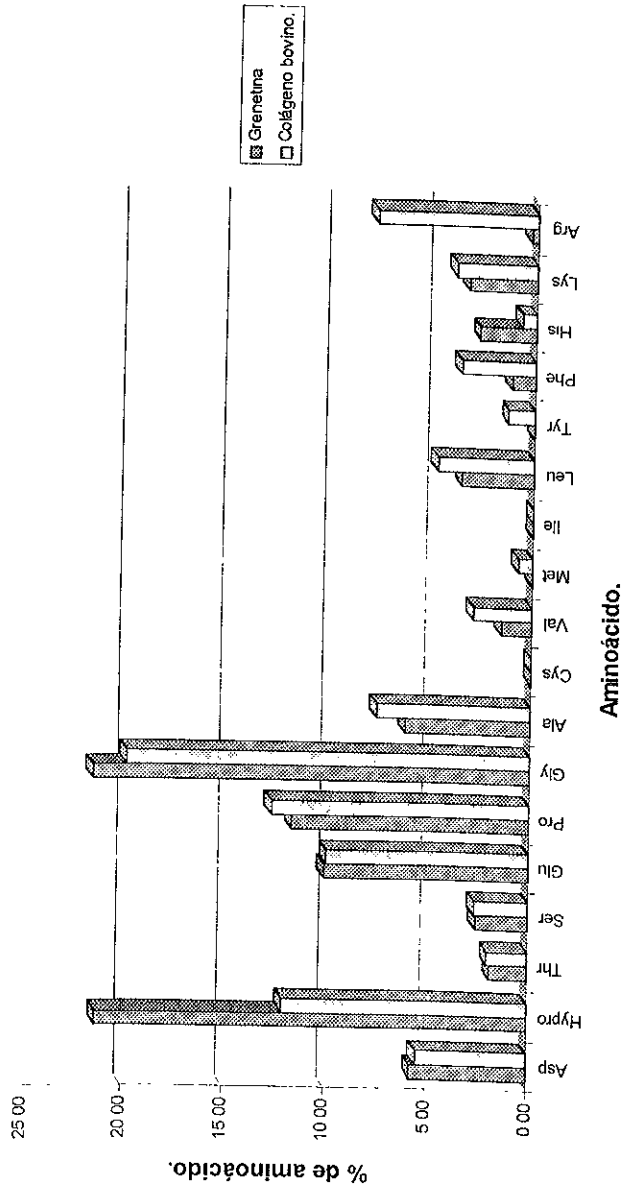
En las fracciones obtenidas de los residuos alcalinos y ácidos (tablas 40 y 41), se observa la presencia de proteínas que presentan pesos moleculares semejantes y precipitan a diferente concentración de sulfato de amonio, estos resultados parecen incorrectos, debido a que a menor concentración de sulfato de amonio precipitan las proteínas con mayor peso molecular y conforme la concentración de sulfato de amonio aumenta, las proteínas precipitadas son de menor tamaño, sin embargo el comportamiento en este caso puede sugerir que la presencia del sulfato de amonio provoca la agregación entre proteínas formándose aglomerados de estas con pesos moleculares elevados que precipitan con concentraciones bajas de sulfato de amonio, es importante destacar que posterior a la precipitación, las fracciones fueron sometidas a una diálisis con el fin de eliminar sales, provocando el fraccionamiento de dichos aglomerados obteniendo proteínas con pesos moleculares variados.

3.3 TERCERA ETAPA

Una vez separadas las proteínas por medio de la cromatografía de exclusión molecular, se llevó a cabo su identificación con ayuda del análisis de aminoácidos para discernir si estas proteínas corresponden a alguna de las proteínas de la piel; adicionalmente se buscó complementar las determinaciones cromatográficas ya que, el análisis de aminoácidos permite conocer si las proteínas separadas son diferentes, o bien se trata de una misma proteína fraccionada.

Para el análisis de aminoácidos se emplearon varios estándares de referencia. a) una mezcla de 18 aminoácidos (anexo tabla 42), que no incluye prolina e hidroxiprolina, b) estándar con prolina e hidroxiprolina (anexo tabla 43), estos dos aminoácidos son importantes para la investigación, ya que aunados a la glicina, permiten identificar al colágeno presente en la piel; estos son los tres aminoácidos que se encuentran en mayor proporción en esta proteína, encontrándose 33% de glicina, 12% de prolina y 10% de hidroxiprolina (Badui, 1993), lo cual no ocurre en otras proteínas, como las globulares, c) estándar de grenetina hidrolizada (anexo tabla 44) con las mismas especificaciones que el aplicado en la columna de cromatografía de exclusión molecular, dicho estándar se empleó como referencia para las muestras problema ya que al no contar con un estándar de colágeno puro se decidió utilizar colágeno hidrolizado (grenetina).

AMINOACIDOS GRENETINA Y COLAGENO BOVINO.



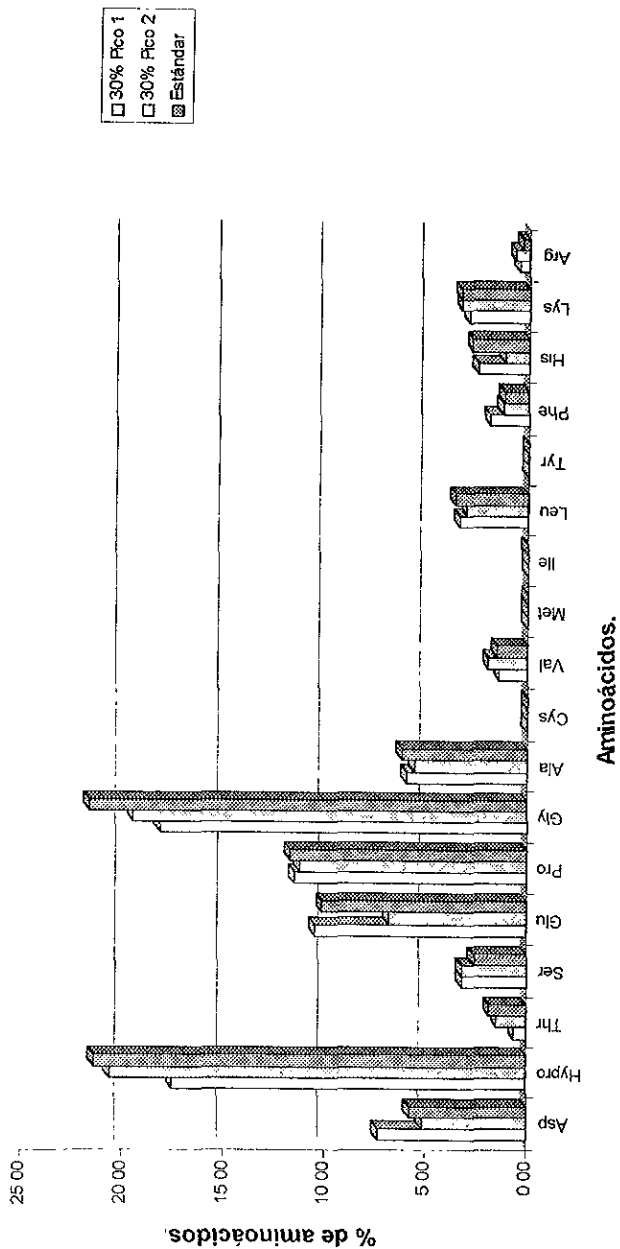
Gráfica 2

Se incluyó la referencia de la composición de aminoácidos del colágeno bovino con el fin de mostrar las semejanzas que existen entre colágeno y grenetina; en los datos correspondientes al estándar de grenetina se observa que los aminoácidos mayoritarios son la glicina con 21.53%, la hidroxiprolina con 21.34%, la prolina con 11.72% y el ácido glutámico con 10.11%, los cuales, como se observa en la gráfica 2, corresponden a los aminoácidos mayoritarios reportados para la proteína colágeno (aunque no muestra las mismas proporciones); con esto se justifica la utilización del estándar de grenetina en ausencia de uno de colágeno.

Antes de realizar la hidrólisis de los estándares de grenetina, se contaba con una cantidad de proteína de 150 μ g/ml para el estándar y 174 μ g/ml para su duplicado, una vez concluido el análisis de aminoácidos se encontró que la cantidad de proteína fue de 85.20 μ g/ml para el estándar y 110.20 μ g/ml para su duplicado; las pérdidas de proteína fueron de 43.20% y 36.6% respectivamente; esta variación en las cantidades de proteína es consecuencia de la pérdida que normalmente se presenta durante la hidrólisis de las muestras, de aquí que en las muestras problema es probable encontrar pérdidas.

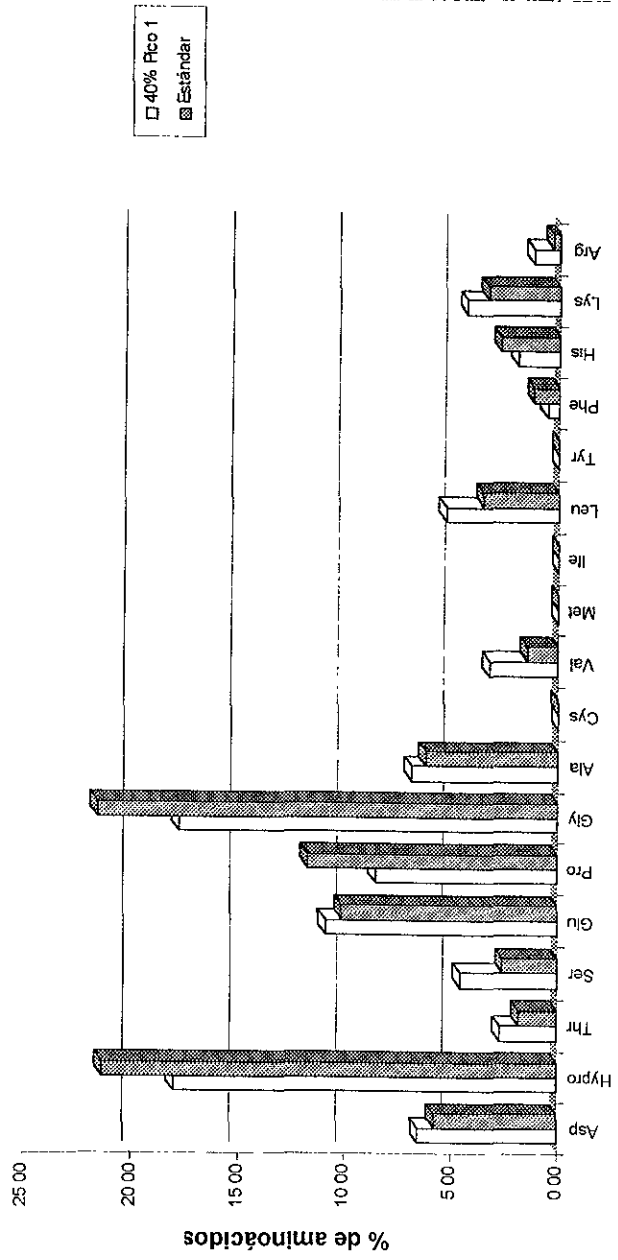
En las gráficas 3 y 4 se presentan los resultados de las muestras problema para el pollo y en base al estándar de grenetina utilizado se refiere su análisis.

**ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS DE LA FRACCIÓN PRECIPITADA
CON 30% (NH₄)₂SO₄ DEL CURTIDO DE POLLO**



Gráfica 3

**ANALISIS DE AMINOACIDOS DE LA FRACCION PRECIPITADA
CON 40% (NH₄)₂SO₄ DEL CURTIDO DE POLLO**



Aminoácidos.

Gráfica 4

Respecto a los valores obtenidos para el contenido de los aminoácidos de las distintas muestras se observa que las fracciones de pollo (30 y 40% de sulfato de amonio), presentan diferencias al ser comparados con el estándar de grenetina. Dichas diferencias pueden atribuirse a factores como ligera contaminación de las fracciones. Aunque no se conserva en su totalidad la proporción de los aminoácidos de las muestras problema) con relación al estándar, se observa en las gráficas 3 y 4 la misma tendencia, los aminoácidos mayoritarios son los mismos para las muestras y el estándar, dichos aminoácidos son glicina, prolina, hidroxiprolina y ácido glutámico.

La cantidad elevada de glicina es un factor poco común en la mayoría de las proteínas, sin embargo es característico de la proteína colágeno, así mismo los aminoácidos prolina e hidroxiprolina se encuentran en mucha mayor proporción en el colágeno que en otras proteínas (Stryer, 1990), por lo tanto las fracciones obtenidas del curtido de patas de pollo probablemente contienen colágeno

A pesar de que la proteína elastina también presenta proporciones similares al colágeno, 33% de glicina y de 10 a 13% de prolina (Domodaran, Paraf, 1992), no contiene hidroxiprolina además presenta una proporción elevada de aminoácidos hidrofóbicos (40%), tomando en cuenta estas referencias, observando la presencia de hidroxiprolina y encontrando que la proporción de aminoácidos hidrofóbicos es menor del 25%; en todas las fracciones obtenidas (pollo), se descarta la presencia de elastina.

En las gráficas 5 a la 12 se muestran los análisis de aminoácidos realizados a las fracciones obtenidas del curtido de la piel de cazón.

Es importante destacar que en las siguientes gráficas los datos se encuentran agrupados por pesos moleculares similares ya que éstos presentaron un perfil de aminoácidos semejante, sin tomar en cuenta el tipo de residuo del que provienen (ácido o alcalino), ni el porcentaje de sulfato de amonio al cual precipitaron (30, 40, 50 o 60%); esto se hizo con el fin de lo que facilitar su análisis, es por eso que en algunas gráficas se observan fracciones provenientes de diferentes residuos y precipitados a diferente concentración de sulfato de amonio.

Como se observa en la gráfica 5 se presenta el perfil de aminoácidos para el pico 1 tanto de la fracción ácida como alcalina precipitada a 30% y cuyo peso molecular es de 575,440 Daltons para ambos casos; esta similitud también se presenta en el perfil de aminoácidos ya que ambos muestran a la glicina, prolina, hidroxiprolina y ácido glutámico como aminoácidos mayoritarios característicos; además de presentar proporciones similares respecto a los demás aminoácidos, por lo que la probabilidad de que estos picos contengan a la proteína grenetina (colágeno) es elevada.

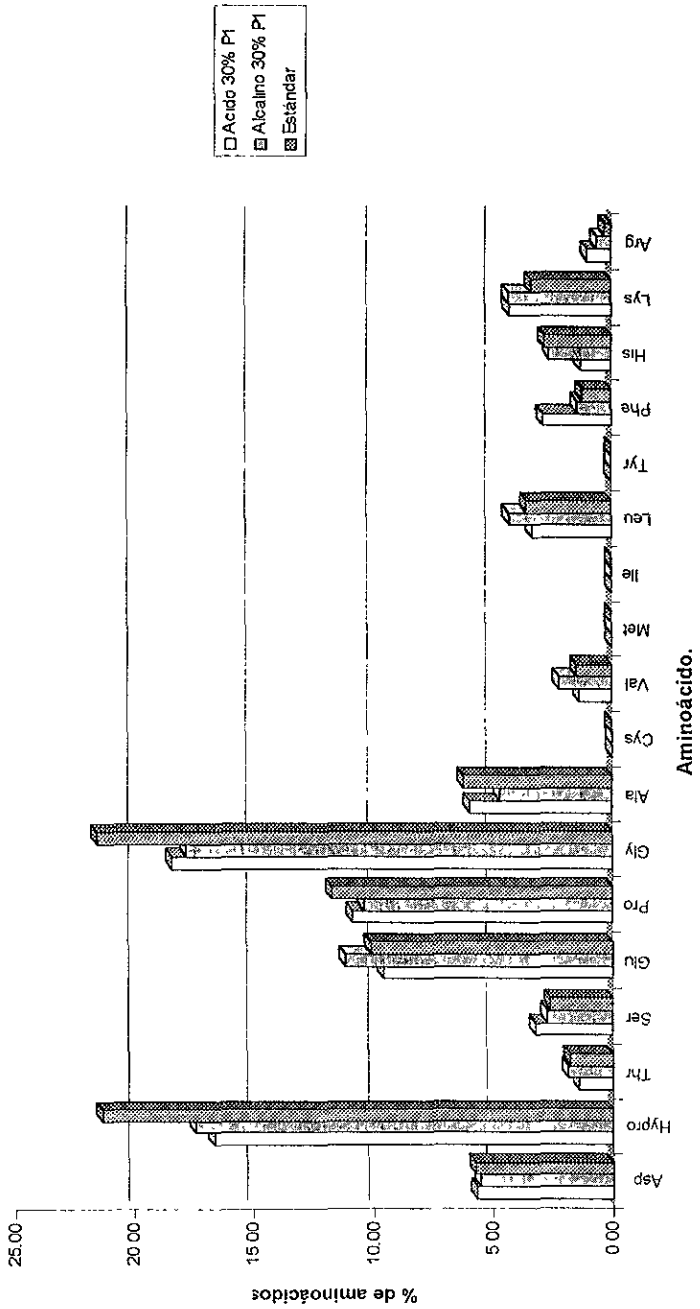
En la gráfica 6 se muestra el perfil de aminoácidos del pico 2 residuo ácido precipitado a 30% cuyo peso molecular es de 208,929 Da. además el pico 1 residuo ácido precipitado a 40% con un peso molecular de 251,188 daltons. y el pico 1 residuo alcalino precipitado a 40% de peso molecular

295,121 Da. Estos tres picos presentan pesos moleculares semejantes y al igual que el perfil de aminoácidos para el estándar de grenetina tienen como aminoácidos mayoritarios a la glicina, prolina, hidroxiprolina y ácido glutámico y en general sus perfiles son similares lo cual sugiere la presencia de grenetina (colágeno) en estas fracciones, sin embargo se debe recordar que el peso molecular de los picos presentados en las gráficas 5 y 6 difieren del peso molecular obtenido para el estándar de grenetina (954,992 Da.) lo que indica una posible fraccionamiento de la proteína, probable acción del proceso de curtido.

En la gráfica 7 se muestra el perfil de aminoácidos del pico 3 residuo ácido precipitado a 30% cuyo peso molecular es de 114,815 Da. además el pico 1 residuo ácido precipitado a 50% con un peso molecular de 112,201 Da. y el pico 1 residuo alcalino precipitado a 50% de peso molecular 165,958 Da. Estos tres picos presentan un comportamiento semejante al observado en los picos que se muestran en las gráficas 11 y 12 por lo que se sugiere la presencia de grenetina (colágeno) fraccionada.

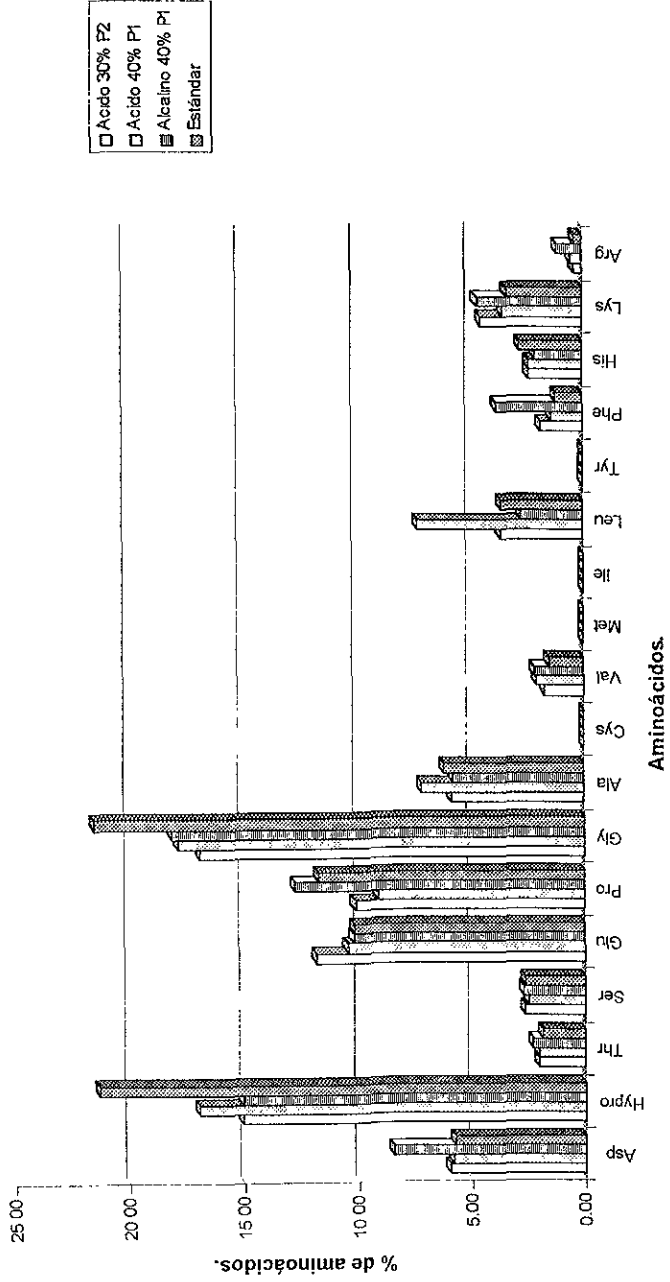
En la gráfica 8 se muestra el pico 2 residuo ácido precipitado a 40% de peso molecular 23,442 Da. y el pico 2 alcalino precipitado a 30% de peso molecular 31,622 Da. que presentan un perfil de aminoácidos similar destacando la elevada proporción de tirosina y la baja proporción de glicina, prolina e hidroxiprolina por lo tanto se descarta la posibilidad de que exista grenetina (colágeno) en estas fracciones, así mismo la proporción de aminoácidos hidrofóbicos es 6.98% y 8.27% respectivamente lo cual elimina la posibilidad de que exista elastina en estas fracciones, porque la elastina contiene un 40% de aminoácidos hidrofóbicos.

ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS DE LAS FRACCIONES PRECIPITADAS CON 30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
DE LOS RESIDUOS ACIDO (PICO1) Y ALCALINO (PICO1) DEL CURTIDO DE CAZON



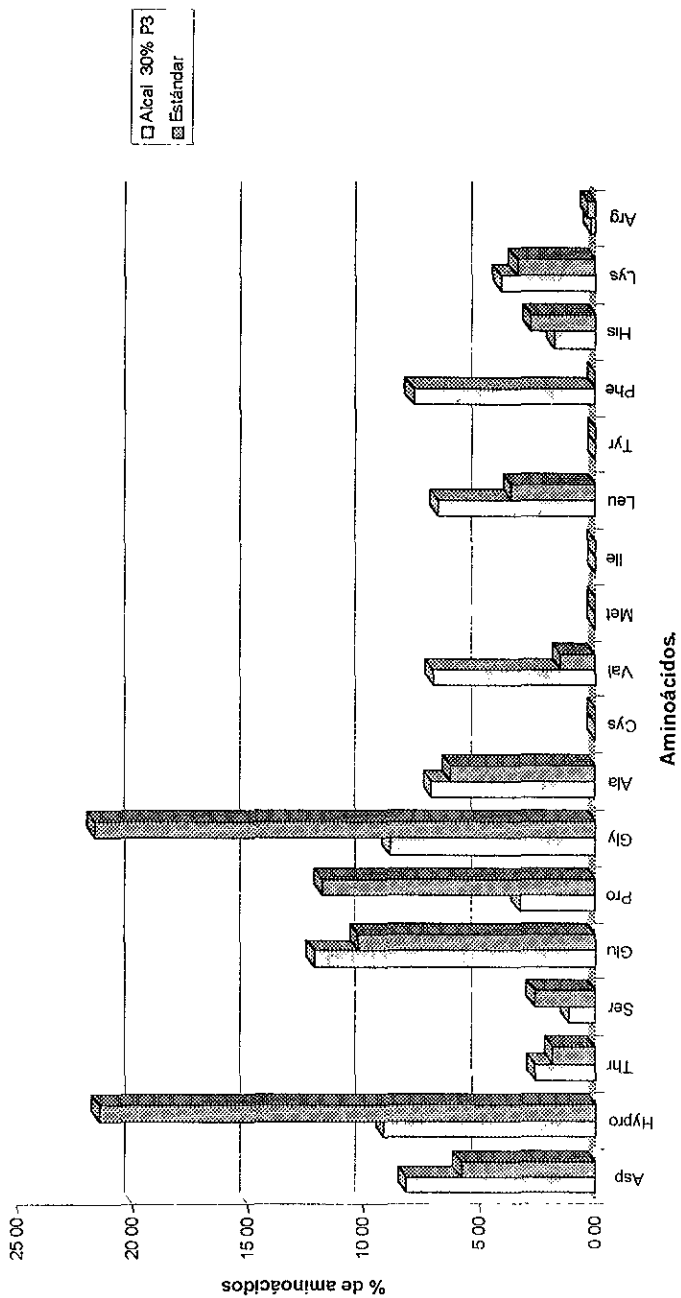
Gráfica 5

ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS DE LAS FRACCIONES PRECIPITADAS CON 30 Y 40%
 (NH₄)₂SO₄ DE LOS RESIDUOS ÁCIDOS (PICOS 1, 2) Y ALCALINOS (PICO 1) DEL
 CURTIDO DE CAZÓN



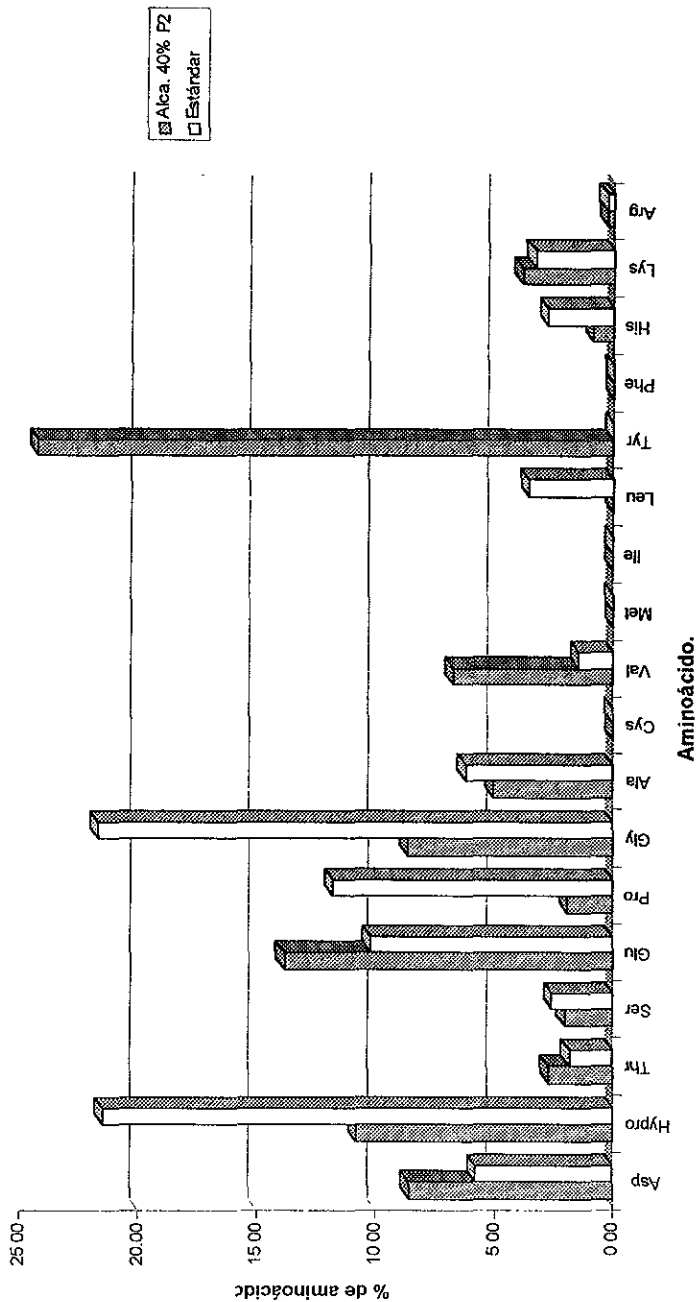
Gráfica 6

ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS DE LA FRACCIÓN PRECIPITADA CON 30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ DE
 LOS RESIDUOS ALCALINOS (PICO 3) DEL CURTIDO DE CAZÓN



Gráfica 7

ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS DE LA FRACCIÓN PRECIPITADA CON 40% (NH₄)₂SO₄ DE LOS RESIDUOS ALCALINOS (PICO 2) DEL CURTIDO DE CAZÓN



Gráfica 8

En la gráfica 9 muestra el perfil de aminoácidos del pico 3 residuo alcalino precipitado al 30% con un peso molecular de 15,135 Da. En este pico el perfil de aminoácidos es completamente diferente al perfil del estándar de grenetina y la proporción de aminoácidos hidrofóbicos es de 24.91% por lo que se descarta la posibilidad de que sea grenetina (colágeno) o elastina, entonces en este pico se encuentra otra proteína o una mezcla de proteínas.

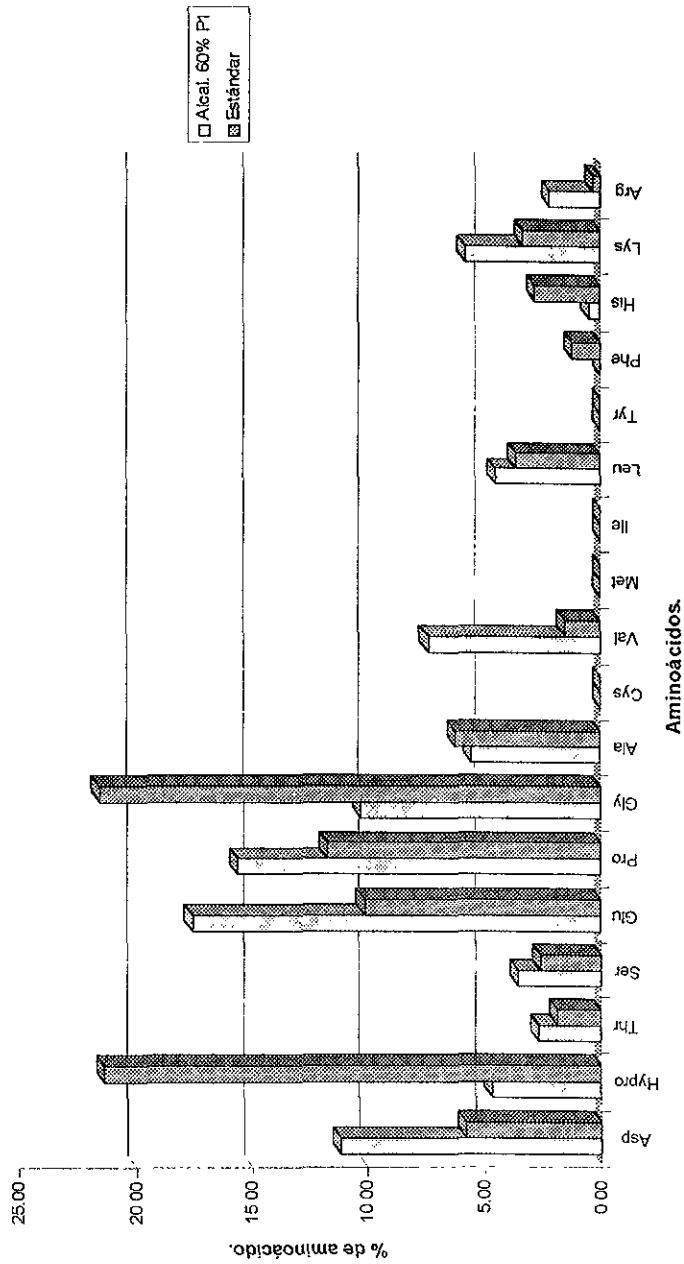
En la gráfica 10 se presenta el pico 2 residuo alcalino 40% de peso molecular 17,782 Da.; se observa una relación de aminoácidos diferente al estándar de grenetina, encontrando como aminoácido mayoritario a la tirosina y ácido glutámico y una proporción de aminoácidos hidrofóbicos de 7.04% descartando entonces la posibilidad de que sea elastina; sin embargo existe una semejanza con los resultados que se observan en la gráfica 14 a pesar de la diferencia en pesos moleculares, destacando la posibilidad de que se trate de un oligomero de la proteína obtenida para el pico 2 residuo alcalino 30% ya que ambos picos pertenecen al residuo alcalino fraccionado por la precipitación con sulfato de amonio a diferentes concentraciones.

En la gráfica 11 se muestra el pico 1 de la fracción ácida a 60% con un peso molecular de 8,128 Da. En este pico se observa una composición particular de aminoácidos con porciones de prolina e hidroxiprolina muy parecidas al estándar de grenetina sin embargo el aminoácido glicina, que es el mayoritario para la proteína en estudio, se encuentra en menor proporción, a pesar de esta característica se puede proponer que la fracción contiene grenetina (colágeno), ya que es importante recordar que existen

múltiples variaciones en la composición de aminoácidos del colágeno las cuales dependen no solo de la especie animal, tipo de tejido y en este caso las condiciones bajo las que se obtuvieron las fracciones. Adicionalmente se debe recordar que los aminoácidos prolina e hidroxiprolina son poco frecuentes en otras proteínas.

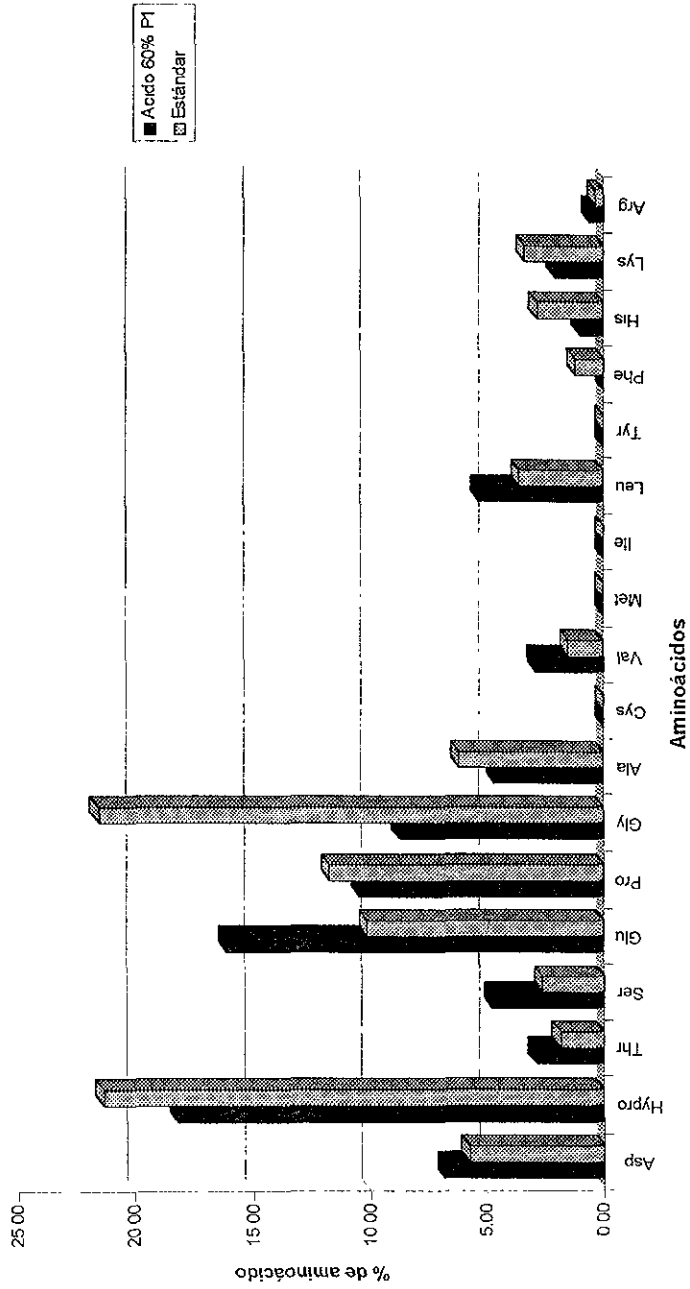
La gráfica 12 corresponde al pico 1 fracción alcalina precipitada al 60% con un peso molecular de 56,234 Da., se observa una relación de aminoácidos diferente al estándar de grenetina (colágeno) encontrando como aminoácidos mayoritarios al ácido aspártico, el ácido glutámico y valina, teniendo una proporción de aminoácidos hidrofóbicos de 35.64%, proporción semejante a la reportada para la elastina (40%), sin embargo no es posible afirmar que se trate de esta proteína ya que debe considerarse la presencia de hidroxiprolina en la muestra, aminoácido que no esta presente en la elastina, posiblemente se trate de una mezcla de colágeno y elastina.

ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS DE LA FRACCIÓN PRECIPITADA CON 60% (NH₄)₂SO₄ DE
LOS RESIDUOS ALCALINOS (PICO 1) DEL CURTIDO DE CAZÓN



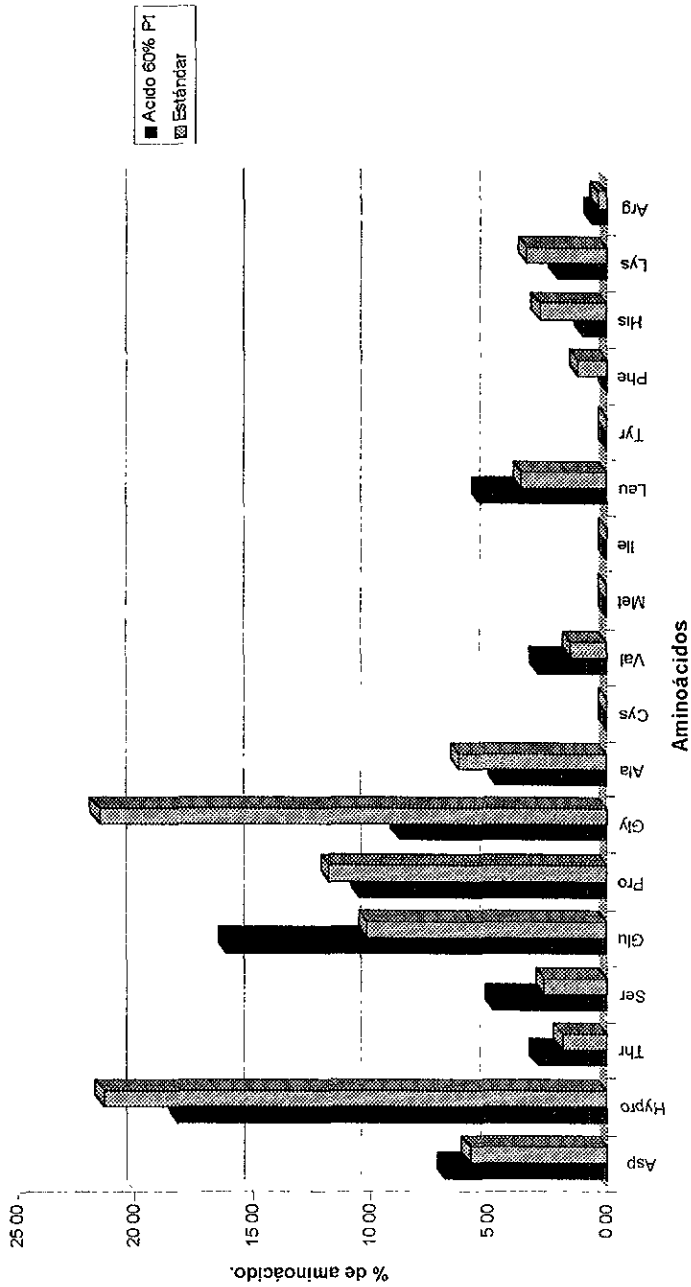
Gráfica 10

ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS DE LA FRACCIÓN PRECIPITADA CON 60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ DE
 LOS RESIDUOS ACIDOS (PICO 1) DEL CURTIDO DE CAZON



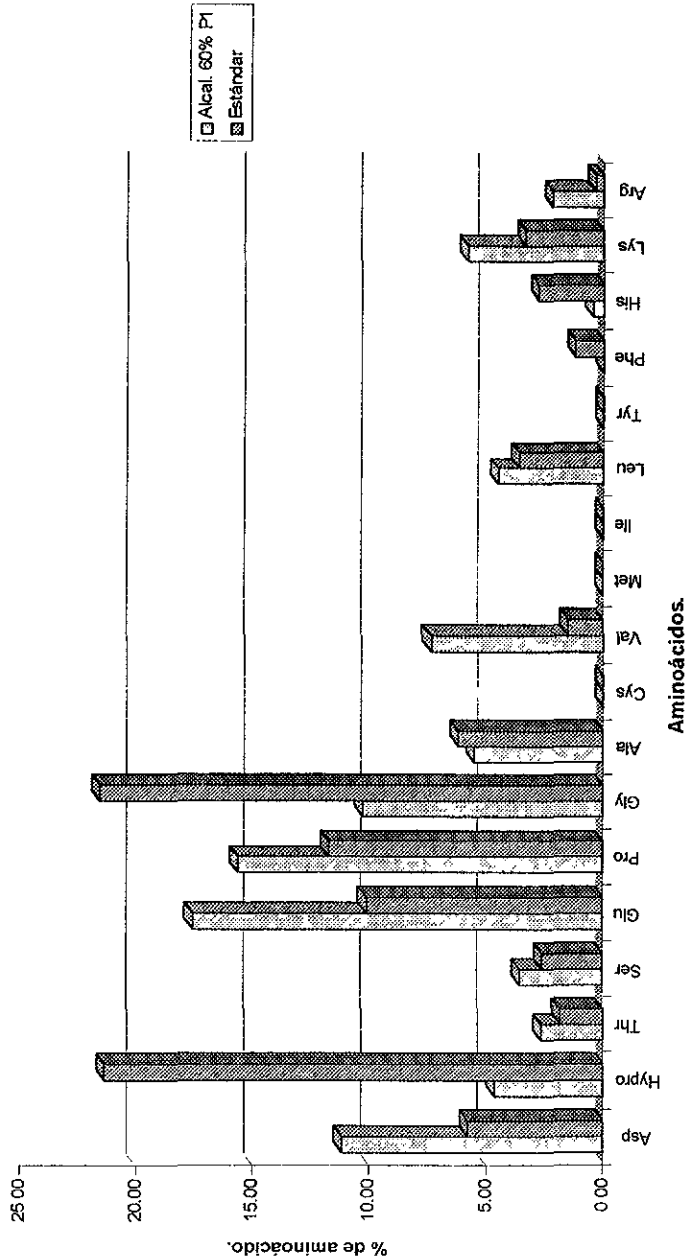
Gráfica 9

ANALISIS DE AMINOACIDOS DE LA FRACCION PRECIPITADA CON 60% $(NH_4)_2SO_4$ DE
 LOS RESIDUOS ACIDOS (PICO 1) DEL CURTIDO DE CAZON

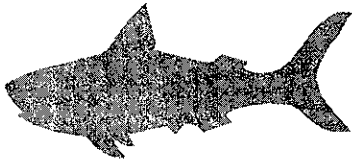


Gráfica 11

ANÁLISIS DE AMINOACIDOS DE LA FRACCIÓN PRECIPITADA CON 60% (NH₄)₂SO₄ DE
LOS RESIDUOS ALCALINOS (PICO 1) DEL CURTIDO DE CAZON



Gráfica 12



CONCLUSIONES

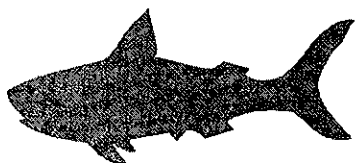


CONCLUSIONES

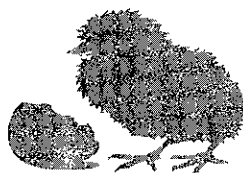
- La concentración óptima de hidróxido de sodio para obtener la mayor cantidad de proteína en los residuos del curtido de las pieles de patas de pollo y cazón en el proceso Xipe es de 20° Be.
- El curtido (proceso Xipe) realizado a una concentración de hidróxido de sodio de 20° Be, para las pieles de patas de pollo y cazón permite obtener pieles de aspecto aceptable.
- El curtido (proceso Xipe) realizado para la piel de cazón a una concentración de hidróxido de sodio de 22° Be, genera pieles dañadas y por lo tanto no comercializables.
- Las proteínas presentes en el residuo alcalino de la piel de patas de pollo, solo precipitan a concentraciones de 30% y 40% de sulfato de amonio.
- Las proteínas presentes en el los residuos ácido y alcalino de la piel de cazón precipitan a concentraciones de 30%, 40%, 50% y 60% de sulfato de amonio
- El peso molecular obtenido por medio de cromatografía de exclusión molecular para el estándar de grenetina utilizado es de 954,992.58 daltons.

- De las fracciones precipitadas (residuo alcalino, pollo) se separaron por medio de cromatografía de exclusión molecular tres proteínas cuyos pesos moleculares son 933,254.3, 173,780.1, 141,253.7 daltons.
- De las fracciones precipitadas (residuo ácido, cazón) se separaron por medio de cromatografía de exclusión molecular siete proteínas cuyos pesos moleculares son 575,440, 251,188.6, 208,929.6, 114,815.4, 112,201.8, 23,442.3, y 8,128.3 daltons.
- De las fracciones precipitadas (residuo alcalino, cazón) se separaron por medio de cromatografía de exclusión molecular siete proteínas cuyos pesos moleculares son 575,440, 295,121 165,958.7, 56,234.1, 31,622.8, 17,782 y 15,135.6, daltons.
- En los residuos ácido y alcalino para la piel de cazón se observa la presencia de compuestos oligoméricos.
- La composición de aminoácidos en el estándar de grenetina empleado es similar a la composición de aminoácidos reportada para el colágeno bovino (Anson et al., 1952)
- La fracción proteínica de los residuos alcalinos obtenidos del curtido de las pieles de las patas de pollo y cazón, se encuentra compuesta en su mayoría por la proteína grenetina o bien colágeno, este resultado concuerda con los datos establecidos en la bibliografía donde se muestra

que la principal proteína de la piel en los vertebrados es el colágeno (1.5% de colágeno y 0.1% de elastina (Badui, 1993)).



BIBLIOGRAFIA



BIBLIOGRAFIA

Aguilar Gallardo R. S., (1990), *Curtido de Pieles de Diez Especies de Peces de la Costa Noroeste de México*, UNAM, Facultad de Química.

Anson M. L., Bailey K., Edsall J. T., (1952), *Advances in protein chemistry*, pp. 94, Vol VII, Academic Press Inc. New York.

Balarezo Manzano P., (1998), *Deterioro químico de lípidos en carne de cerdo y pollo en congelación*, Tesis, UNAM, Facultad de Química.

Badui Dergal S., (1993), 3era Edn.; *Química de los alimentos*, pp. 150, 192-193, Edit. Alhambra Mexicana, México.

Bolaños Campos J., (1989), *Estructura, composición y propiedades de la elastina y sus aplicaciones en Cosmetología*, Tesis, UNAM, Facultad de Química.

Bose and B.M. Das, Vol. 11, No. 12, pp. 645-656, (Dic. 1956), *Amino acid composition of diferent proteins prepared from skins and hides of Indian animals*. The journal of the American Leather Chemists Association.

Broitman Kutenplon B., (1972), *Evaluación y control de la contaminación producida por la industria de la curtiduría*, Tesis, UNAM, Facultad de Química.

CONACYT-Universidad de Guadalajara., (1975), *Proceso Xipe. Una nueva Tecnología para la preparación y curtido de pieles*, Serie Estudios, México.

Cormack H. D., (1988), 9na Edn., *Histología de HAM*, pp. 190-199. Harla, México.

Cutran Ramzi S., (1990), 4ta Edn., *Patología Estructural y Funcional*, pp. 80-81, Interamericana McGraw Hill, Mexico.

Cheffel,Cuq,Lorient, (1989), *Proteínas alimentarias*, pp. 151-153, Acribia, S.A., Zaragoza España.

Del Cueto de la Fuente E., (1991), *Trabajo de Ribera sin consumo de agua*,XXI CONGRESO DE LA IULTOS, Barcelona España.

Donoso Moscoso S. P., (1996), *Evaluación de deterioro químico en carne de res y pescado congelados*, Tesis, UNAM, Facultad de Química.

Elizalde David J.L., (1973), *Situación Económica actual, problemas y perspectivas de la industria curtidora en México*, Tesis, UNAM, Facultad de Economía.

Geracimo Bracho E. and Norman Haard F., (1990), *Determination of collagen crosslinks in Rockfish skeletal muscle*. Journal of Food Biochemistry pp. 435-451.

Hansen C. L., Ockerman H.W., (1994), *Industrialización de subproductos de origen animal*, pp. 87-129, Acribia S.A, Zaragoza España.

Kjetzman U., (1974), *Inspección Veterinaria de Pescados*, Edit. Acribia, Zaragoza España.

Krahmer R., Schröder L., (1974), 1era Edn., *Anatomía de los animales domésticos* Edit. Acribia, Zaragoza España.

Lehninger A. L., Nelson D. L., Cox M. M., (1993), *Principles of Biochemistry*, pp. 157 - 181, Second Edition, Worth Publishers Inc. Ney York.

Mondragón Jaimes I., (1989), *Evaluación y aplicación de técnicas analíticas en el área alimentaria*, Tesis, UNAM, Facultad de Química.

Morgan R., Martin L. Y., Jul-Ago, (1997), *Bioengineered skin substitutes*, Science & Medicine, pp. 6-15.

Murray, Granner, Mayes, Rodwell, (1994), 13ava. Edn., *Bioquímica de Harper*, pp. 757-771, El Manual Moderno, México D.F.

Murray Deutscher P.; (1997), *Methods in Enzimology. Guide to protein purification*, pp. 290-296, Academic Press USA.

Padilla González J., (1977), *Curtido al Cromo de pieles. Teoría general*, Tesis, UNAM, Facultad de Química.

Paulsen Douglas F., (1991), *Histología Básica*, pp. 84, El manual Moderno S.A de C.V, México D.F.

Peña Diaz A., (1995), *Bioquímica*, pp. 96-101 Edit. Limusa, México.

Ramírez López P. H., (1973), *Análisis técnico de la proteínas hidrolizadas obtenidas del cuero*, Tesis, UNAM, Facultad de Química.

Ríos Ramírez A., (1975), *Curtido rápido de suela con curtientes vegetales*, Tesis, UNAM, Facultad de Química.

Scopes R., (1986), 4ta. Edn., *Protein purification Principles and practica*, Springer-Verlay.

Segel I. H., (1982), *Cálculos de bioquímica*, pp. 155-157, Edit. Acribia, Zaragoza España.

Solis Morales L.M., (1978), *Comparación en los procesos de curtición tradicional y Xipe*, Tesis, Universidad de Guadalajara., Escuela Politécnica.

Soto Gavidia D., (1988), *El Colágeno y su aplicación en productos cosméticos*, Tesis, UNAM, Facultad de Química.

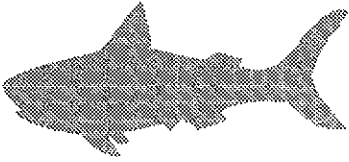
Southgate D. A. T., (1990), *Detemination of Food Carbohydrates*, Elsevier Applied Science.

Strayer Lubert., (1990), *Bioquímica* (3era Edn.), pp. 267-282. Reverté, España.

Theodore L. Brown , H. Eugene LeMay, Jr., (1985), 3era. Edn., *Química la ciencia central*, pp. 764-765, Prentice-Hall Hispanoamericana S.A, México.

Thortensen, Thomas C., (1969), *Practical Leather Technology*, pp. 258, Van Nostrand Reinhold Company. New York.

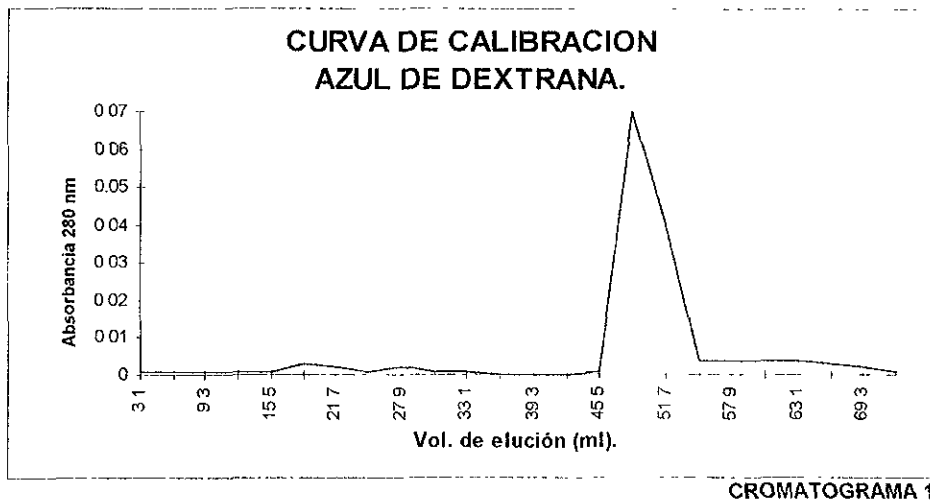
White,Handler, Smith, Hill, Lehmen, (1983), 2da Edn., *Principios de Bioquímica*, pp. 1210-1223, McGraw-Hill de México, España.



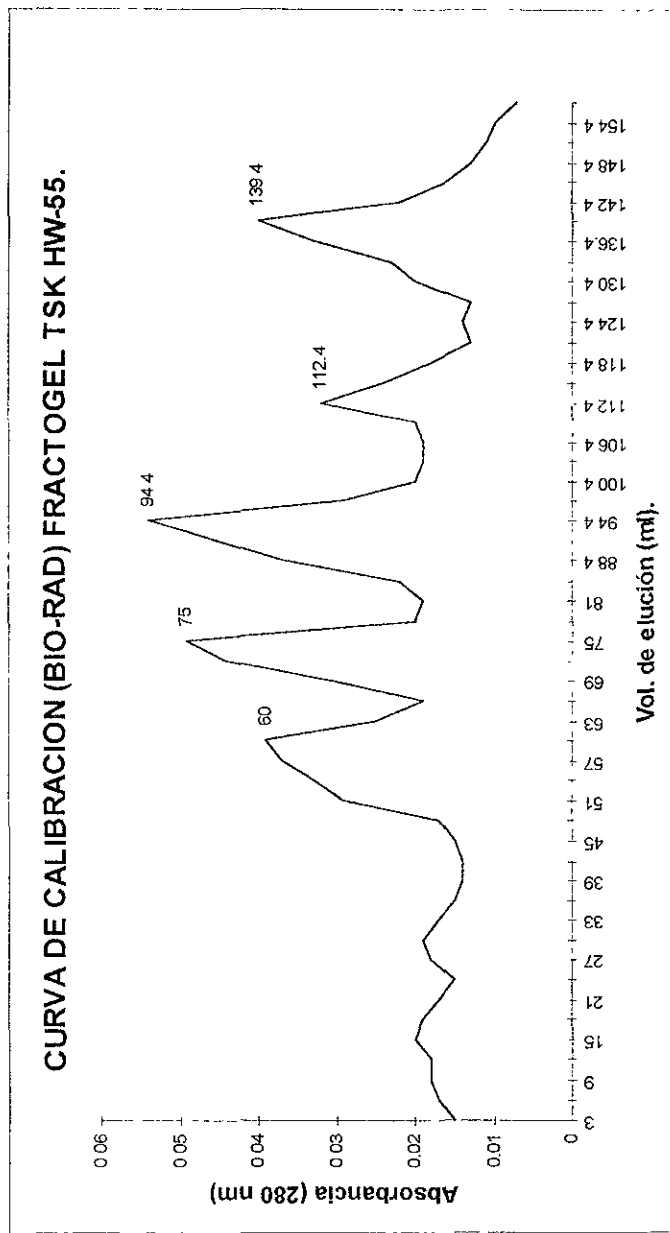
ANEXO



ANEXO



Posterior a la calibración con Azul de Dextrana se inyectó un estándar de proteínas con diferentes pesos moleculares, el cromatograma dos presenta la curva de calibración



A continuación se presentan las tablas de los estándares utilizados.

ESTANDAR DE AMINOACIDOS

AMINOACIDO	PESO MOLECULAR
Acido aspártico	133
Treonina	119
Serina	105
Acido glutámico	147
Glicina	75
Alanina	89
Cistina	121
Valina	117
Metionina	149
Isoleucina	131
Leucina	131
Tirosina	181
Fenilalanina	165
Histidina	155
Lisina	146
Arginina	174

Concentración de aminoácidos: 100nmol/ml. Cistina: 50nmol/ml

Tabla 42

ESTANDAR DE PROLINA - HIDROXIPROLINA

AMINOACIDO	PESO MOLECULAR
Hidroxiprolina	131
Prolina	115

Concentración prolina, hidroxiprolina: 1250nmol/ml

Tabla 43

ESTANDAR DE GRENETINA

Aminoácido	% aa. Grenetina.	% aa Colágeno bovino. *
Ac. Aspártico.	5.76 ± 0.70	5.50
Hidroxiprolina	21.34 ± 1.05	12.10
Treonina	1.85 ± 0.66	2.00
Serina	2.61 ± 1.55	2.70
Ac. Glutámico	10.12 ± 0.71	10.00
Prolina	11.71 ± 0.81	12.70
Glicina	21.53 ± 0.19	19.90
Alanina	6.19 ± 0.09	7.60
Cistina	0.00	0.00
Valina	1.48 ± 0.46	2.90
Metionina	0.00	0.70
Isoleucina	0.00	---
Leucina	3.58 ± 0.07	4.80
Tirosina	0.00	1.30
Fenilalanina	1.20 ± 0.36	3.70
Histidina	2.79 ± 1.22	---
Lisina	3.36 ± 0.10	4.00
Arginina	0.32 ± 0.15	7.90
Total	100.17	99.60

* Anson et al 1952

Tabla 44

POR CIENTO DE AMINOACIDOS DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS (POLLO)

AMINOACIDO	% aminoácido promedio (30% pico 1)	% aminoácido promedio (30% pico 2)	% aminoácido promedio (40% pico 1)
Ac. Aspártico.	7.35 ± 0.03	5.17 ± 0.68	6.55 ± 0.64
Hidroxiprolina	17.46 ± 0.76	20.53 ± 0.37	17.96 ± 1.63
Treonina	0.60 ± 0.10	1.45 ± 0.94	2.75 ± 0.35
Serina	3.21 ± 0.11	3.20 ± 0.89	4.60 ± 1.87
Ac. Glutámico	10.47 ± 0.18	6.79 ± 0.42	10.91 ± 1.02
Prolina	11.47 ± 0.67	11.24 ± 1.66	8.53 ± 0.43
Glicina	18.12 ± 2.46	19.42 ± 1.29	17.76 ± 0.30
Alanina	5.95 ± 0.50	5.58 ± 0.55	6.87 ± 0.24
Cistina	0.00	0.00	0.00
Valina	1.37 ± 0.08	1.93 ± 0.67	3.23 ± 0.43
Metionina	0.00	0.00	0.00
Isoleucina	0.00	0.00	0.00
Leucina	3.35 ± 0.18	3.02 ± 0.26	5.29 ± 0.10
Tirosina	0.00	0.00	0.00
Fenilalanina	1.91 ± 0.37	1.27 ± 0.06	0.57 ± 0.09
Histidina	2.48 ± 0.33	1.17 ± 0.07	1.96 ± 0.82
Lisina	2.97 ± 0.28	3.33 ± 2.80	4.40 ± 0.69
NH ₃	10.99 ± 1.70	14.72 ± 9.61	7.38 ± 0.45
Arginina	0.50 ± 0.12	0.68 ± 0.15	1.26 ± 0.29
<i>Total</i>	98.20	99.50	100.02

**CONCENTRACION DE AMINOACIDOS DE LAS FRACCIONES
OBTENIDAS (30% (NH₄)₂SO₄ CAZON)**

A.A	FRACCION ACIDA.			FRACCION ALCALINA.		
	% aa 30% pico 1	%aa 30% pico 2	% aa 30% pico 3	% aa 30% pico 1	% aa 30% pico 2	% aa 30% pico 3
Asp	5.64 ± 0.28	5.98 ± 0.49	7.78 ± 0.78	5.56 ± 0.76	8.06 ± 0.50	8.17 ± 0.64
Hypro	16.63 ± 0.34	15.08 ± 0.73	18.86 ± 0.18	17.38 ± 1.66	8.02 ± 0.06	9.13 ± 0.12
Thr	1.43 ± 0.35	2.01 ± 0.041	1.38 ± 0.20	1.89 ± 0.22	2.67 ± 0.48	2.62 ± 0.54
Ser	3.22 ± 1.06	2.64 ± 0.25	3.45 ± 0.05	2.76 ± 0.46	3.98 ± 0.23	1.15 ± 0.40
Glu	9.56 ± 0.14	11.82 ± 0.47	10.63 ± 0.42	11.18 ± 1.72	14.58 ± 0.43	12.13 ± 0.80
Pro	10.84 ± 0.56	10.08 ± 0.09	7.24 ± 0.34	10.38 ± 4.69	3.49 ± 0.40	3.24 ± 1.01
Gly	18.40 ± 0.48	16.87 ± 0.55	18.58 ± 0.18	17.80 ± 1.01	6.76 ± 2.75	8.86 ± 0.33
Ala	5.94 ± 0.10	5.80 ± 0.40	5.44 ± 0.86	4.67 ± 1.36	4.78 ± 0.34	7.04 ± 0.52
Cys	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Val	1.38 ± 0.17	1.72 ± 0.29	1.91 ± 0.13	2.20 ± 0.01	5.27 ± 0.38	6.99 ± 0.03
Met	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Ile	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Leu	3.34 ± 0.40	3.61 ± 0.06	4.69 ± 0.96	4.26 ± 0.05	0.00	6.78 ± 0.24
Tyr	0.00	0.00	0.00	0.00	21.28 ± 0.50	0.00
Phe	2.88 ± 0.39	1.89 ± 0.050	0.00	1.44 ± 0.02	0.00	7.85 ± 0.26
His	1.30 ± 0.55	2.33 ± 0.050	1.07 ± 0.76	2.59 ± 0.89	1.52 ± 0.35	1.75 ± 0.65
Lys	4.25 ± 0.58	4.48 ± 0.15	3.08 ± 0.38	4.25 ± 0.22	2.30 ± 0.31	4.11 ± 0.76
Arg	1.04 ± 0.08	0.35 ± 0.10	1.19 ± 0.94	0.62 ± 0.11	1.05 ± 0.05	0.21 ± 0.06

**CONCENTRACIÓN DE AMINOACIDOS DE LAS FRACCIONES
OBTENIDAS (40% (NH₄)₂SO₄ CAZON)**

AMINOAC.	FRACCION ACIDA		FRACCION ALCALINA	
	% aa 40% pico 1	% aa 40% pico 2	% aa 40% pico 1	% aa 40% pico 2
Asp	5.82 ± 0.58	8.87 ± 0.25	8.47 ± 1.12	8.63 ± 0.11
Hypro	16.98 ± 0.17	4.00 ± 0.37	15.13 ± 0.90	10.81 ± 0.25
Thr	2.00 ± 0.01	2.09 ± 0.84	2.27 ± 0.32	2.76 ± 0.36
Ser	2.50 ± 0.37	3.92 ± 0.69	2.70 ± 0.10	2.05 ± 0.78
Glu	10.42 ± 0.26	11.69 ± 0.66	10.15 ± 0.97	13.83 ± 0.67
Pro	9.05 ± 0.60	3.08 ± 0.35	12.71 ± 0.74	1.95 ± 0.77
Gly	17.89 ± 0.34	6.96 ± 0.25	18.12 ± 0.47	8.67 ± 0.06
Ala	7.12 ± 0.69	3.90 ± 0.84	5.76 ± 0.21	5.09 ± 0.11
Cys	0.00	0.00	0.00	0.00
Val	2.06 ± 0.11	4.98 ± 0.27	2.14 ± 0.01	6.77 ± 0.16
Met	0.00	0.00	0.00	0.00
Ile	0.00	0.00	0.00	0.00
Leu	7.24 ± 2.68	0.00	2.71 ± 0.26	0.00
Tyr	0.00	22.13 ± 1.18	0.00	24.27 ± 0.99
Phe	1.38 ± 0.29	0.00	3.82 ± 0.49	0.00
His	2.35 ± 0.20	1.51 ± 0.04	2.09 ± 0.01	0.90 ± 0.04
Lys	3.52 ± 0.34	3.91 ± 0.66	4.67 ± 0.32	3.91 ± 0.21
Arg	0.48 ± 0.03	5.78 ± 0.39	1.12 ± 0.30	0.80 ± 0.09

**CONCENTRACION DE AMINOACIDOS DE LAS FRACCIONES
OBTENIDAS (50 y 60 % (NH₄)₂SO₄ CAZON)**

AMINOAC.	FRACCION ACIDA		FRACCION ALCALINA	
	% aa 50% pico 1	% aa 60% pico 1	% aa 50% pico 1	% aa 60% pico 1
Asp	6.56 ± 0.04	6.82 ± 0.39	7.51 ± 1.06	11.16 ± 0.89
Hypro	17.79 ± 0.18	18.21 ± 1.71	15.24 ± 0.31	4.61 ± 1.12
Thr	1.57 ± 0.08	2.86 ± 0.30	1.63 ± 0.68	2.64 ± 0.16
Ser	3.31 ± 0.35	4.80 ± 0.14	2.52 ± 0.31	3.53 ± 0.08
Glu	9.60 ± 0.80	16.09 ± 1.64	12.10 ± 1.79	17.54 ± 0.05
Pro	10.63 ± 0.73	10.46 ± 1.54	7.71 ± 1.24	15.58 ± 4.31
Gly	18.44 ± 0.94	8.73 ± 0.08	15.50 ± 0.84	10.27 ± 0.54
Ala	5.94 ± 0.38	4.64 ± 0.16	5.03 ± 0.69	5.54 ± 0.29
Cys	0.00	0.00	0.00	0.00
Val	1.99 ± 0.18	2.87 ± 0.07	2.00 ± 0.07	7.38 ± 0.01
Met	0.00	0.00	0.00	0.00
Ile	0.00	0.00	0.00	0.00
Leu	6.12 ± 2.90	5.32 ± 0.72	4.06 ± 0.71	4.52 ± 1.48
Tyr	0.00	0.00	0.00	0.00
Phe	0.00	0.00	1.50 ± 0.18	0.00
His	1.22 ± 1.02	0.96 ± 0.18	1.83 ± 0.27	0.46 ± 0.08
Lys	4.02 ± 0.18	2.05 ± 0.52	2.43 ± 0.12	5.79 ± 0.14
Arg	0.83 ± 0.13	0.60 ± 0.07	1.11 ± 0.33	2.18 ± 0.26

La cantidad de proteína inyectada para las fracciones de cazón fue de $8\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ ($80\mu\text{g}/\text{ml}$) y de $12\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ ($120\mu\text{g}/\text{ml}$) de esta manera en la siguiente tabla se observa que las pérdidas de material proteínico fueron:

**POR CIENTO DE PERDIDA DE PROTEINA
(CAZON).**

FRACCION ACIDA			FRACCION ALCALINA		
30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	% PROT. FINAL	% DE PERDIDA	30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	% PROT. FINAL	% DE PERDIDA
PICO 1* (575,440.0)	75.00	37.50	PICO 1• (575,440.0)	45.00	43.75
PICO 2* (208,929.6)	68.00	43.33	PICO 2* (31,622.8)	81.00	32.50
PICO 3• (114,815.4)	44.00	45.00	PICO 3• (15,135.6)	57.00	28.75
40% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$			40% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		
PICO 1• (251,188.6)	48.00	40.00	PICO 1• (295,121.0)	54.00	32.50
PICO 2* (23,442.3)	90.00	25.00	PICO 2* (17,782.0)	73.00	39.17
50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$			50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		
PICO 1• (112,201.8)	50.00	37.50	PICO 1• (165,958.7)	37.00	53.75
60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$			60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		
PICO 1• (8,128.3)	53.00	33.75	PICO 1• (56,234.1)	53.00	33.75

Los pesos moleculares de cada pico se encuentran entre paréntesis.

*Concentración $120\mu\text{g}/\text{ml}$.

•Concentración $80\mu\text{g}/\text{ml}$.

% Proteína final obtenida después del análisis de aminoácidos.