

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES  
FACULTAD DE TECNOLOGIA  
CARRERA QUÍMICA INDUSTRIAL**



**PROYECTO DE GRADO**

***“RECUPERACION DE COLAGENO DE DESECHOS DE SABALO,  
ESPECIE DE PESCADO CONSUMIDO EN LA CIUDAD DE LA PAZ,  
CON FINES COSMETOLOGICOS”.***

**POSTULANTE: MARIA TATIANA HUANCA**

**TUTORES: Ph.D. JOSÉ LUIS VILA CASTRO**

**Lic. PATRICIA DUCHEN URIARTE**

**LA PAZ-BOLIVIA  
2014**

## **AGRADECIMIENTOS**

*A mis tutores Ph.D José Luis Vila por las enseñanzas recibidas, por su paciencia, tiempo, confianza y apoyo incondicional en el desarrollo del proyecto. Lic. Patricia Duchén por encaminarme y motivarme para poder culminar esta etapa, por sus enseñanzas, su colaboración y gran dedicación.*

*A la Dr. María Monasterios, Dr. Vargas, Lic. Pablo Pacohuanca por tomarse el tiempo de calificar este proyecto y aportar con su conocimiento al desarrollo del mismo, gracias por las correcciones y aportes.*

*A la carrera de Ciencias Químicas por abrirme las puertas, para la realización del proyecto.*

*A la carrera de Química Industrial por la formación académica.*

## **DEDICATORIA**

*A mi mamá por toda su lucha y esfuerzo*

*para poder brindarme una educación.*

*Por su incondicional amor y entrega de cada día.*

*A mi hermana por todos los momentos compartidos,*

*por cuidarme y estar siempre*

*que la necesito.*

*Las amo mucho*

## INDICE

### CAPITULO I

Introducción .....	1
1.1. Antecedentes.....	2
1.2. Planteamiento del Problema .....	4
1.3. Justificación .....	5
1.4. Objetivos.....	5
1.4.1. Objetivo General.....	5
1.4.2. Objetivos Específicos .....	6

### CAPITULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. Materia prima.....	7
2.2. Generalidades .....	7
2.2.1. Distribución geográfica .....	7
2.2.2. Biología y Ecología .....	7
2.2.3. Uso de la especie .....	8
2.3. Escamas de pesado .....	8
2.4. Química .....	8
2.4.1. Aplicaciones de la química verde.....	9
2.4.2. Principios de la química verde .....	10
2.5. Aminoácidos y Proteínas .....	11
2.5.1. Composición de aminoácidos en las proteínas .....	12
2.5.2. Estructura de los Aminoácidos .....	12
2.5.3. Proteínas .....	13
2.5.3.1. Estructura de las Proteínas .....	14
2.5.4 Propiedades características de las proteínas.....	14
2.5.4.1 Capacidad amortiguadora .....	14
2.5.4.2 Solubilidad.....	14
2.5.4.3. Desnaturalización.....	15
2.5.4.4. Especificidad .....	15
2.6. Usos y aplicaciones del colágeno .....	15
2.6.1. Industria Alimentaria .....	15
2.6.2. En la industria Farmacéutica y Cosmética .....	16
2.7. Colágeno .....	17
2.7.1. El colágeno es la proteína más abundante en el mundo animal .....	17
2.7.2. Colágeno, una proteína fibrosa.....	17
2.7.3. Estructura química del colágeno.....	18
2.8. Acetilación del colágeno .....	19
2.9. Fuentes de obtención .....	20
2.9.1. Colágeno en organismos terrestres .....	20
2.9.2. Colágeno en organismos acuáticos .....	20
2.9.2.1. Propiedades del colágeno de organismos acuáticos .....	21
2.10. Técnicas Analíticas de identificación.....	21
2.10.1. Pruebas cualitativas.....	21
2.10.1.1. Prueba de Biuret .....	21
2.10.1.2. Prueba de Ninhidrina.....	22
2.10.2. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear RMN .....	23
2.10.2.1. Espectrometría de RMN del protón <sup>1</sup> H.....	23
2.10.2.2. Espectrometría de RMN del <sup>13</sup> C.....	23
2.10.3. Espectroscopia infrarroja .....	24
2.10.3.1. Vibración molecular .....	24
2.10.3.2. Absorción de grupos funcionales comunes de una Proteína .....	25
2.11. Fundamento teórico para la elaboración de una crema con colágeno.....	26
2.11.1. Propiedades cosméticas del colágeno.....	26
2.11.2. Conceptos básicos para elaborar una crema.....	27

2.11.3. Comunidad andina de naciones decisión N° 516.....	27
2.10.3.1. Notificación sanitaria obligatoria .....	27
<b>CAPITULO III: PARTE EXPERIMENTAL</b>	
3.1. Procedimiento .....	28
3.2. Equipos y reactivos.....	28
3.3. Diagrama de flujo del proceso.....	29
3.4. Muestra de análisis .....	30
3.5. Recolección y tratamiento de la materia prima.....	30
3.5.1. Recolección.....	30
3.5.2. Tratamiento de la muestra .....	30
3.6. Extracción del colágeno .....	31
3.6.1. Filtración.....	32
3.6.2. Producto .....	32
3.6.3. Conservación del producto para evitar su descomposición.....	32
3.7. Identificación de la proteína .....	34
3.7.1. Identificación mediante el método de IR .....	34
3.7.2. Pruebas cualitativas de identificación para el colágeno .....	35
3.7.2.1. Prueba de Biuret .....	35
3.7.2.2. Prueba de la Ninhidrina .....	36
3.8. Acetilación del colágeno .....	36
3.8.1. Solubilidad del derivado acetilado.....	39
3.8.2. Identificación del derivado acetilado por RMN .....	39
3.9. Procedimiento para la elaboración de una crema cosmética.....	39
3.9.1. Materiales y reactivos .....	39
3.9.1.1. Cristalería.....	39
3.9.1.2. Reactivos .....	39
3.9.2. Tratamiento al colágeno obtenido en el proyecto.....	39
3.9.2.1. Ablandamiento del producto “colágeno” .....	40
3.9.3. Elaboración de la crema .....	41
3.9.4. Caracterización de la crema elaborada con el colágeno .....	41
3.9.4.1. Análisis microbiológico .....	41
3.9.4.2. Propiedades fisicoquímicas y organolépticas .....	43
<b>CAPITULO IV: ANALISIS Y RESULTADOS</b>	
4.1. Efecto del tiempo de extracción sobre la mayor cantidad de pérdida de agua .....	44
4.2. Balance de materia del proceso .....	46
4.2.1. Escala de análisis del proceso.....	48
4.2.2. Calculo del rendimiento semi cuantitativo .....	49
4.3. Caracterización de la proteína .....	49
4.3.1. Evaluación sensorial como una medición de calidad al producto final ...	49
4.3.2. Comparación de la muestra con un patrón, mediante espectroscopia de infrarrojo .....	50
4.3.3. Resultados de infrarrojo.....	52
4.3.4. Pruebas cualitativas.....	53
4.4. Resultados de resonancia magnética nuclear, <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C, del derivado acetilado..	53
4.4.1. Reacción de acetilación.....	57
4.4.2. Rendimiento semi cuantitativo del compuesto derivado de la acetilación	58
4.4.3. Solubilidad.....	58
4.5. Análisis de calidad de la crema cosmetológica .....	59
4.5.1. Resultados del análisis microbiológico de la crema .....	59
4.5.2. Propiedades fisicoquímicas y organolépticas.....	60
<b>CAPITULO V</b>	
Conclusiones .....	61
<b>CAPITULO VI</b>	
Recomendaciones .....	63

**CAPITULO VII**

Bibliografía..... 64

**ANEXOS**

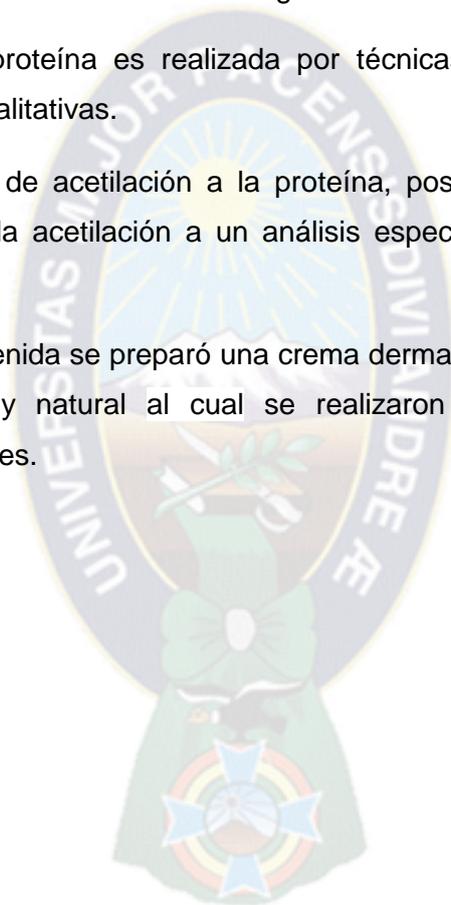
## RESUMEN

De los residuos (escamas y aletas) de sábalo *Prochilodus lineatus*, se extrajo colágeno, proteína que fue aislada por medio de técnicas que involucran la química verde, ya que se utilizó como único solvente agua.

La identificación de la proteína es realizada por técnicas espectrofotométricas de infrarrojo IR y pruebas cualitativas.

Se realizó una reacción de acetilación a la proteína, posteriormente se sometió el compuesto derivado de la acetilación a un análisis espectroscópico de Resonancia Magnética Nuclear.

Con la materia prima obtenida se preparó una crema dermatológica, como formulación cosmética, producto muy natural al cual se realizaron pruebas microbiológicas, fisicoquímicas y sensoriales.



## CAPITULO I

### 1. INTRODUCCION

Es bien sabido que el pescado y los productos del mar en general son alimentos que no se conservan fácilmente.

La degradación proteica se produce inmediatamente después de la muerte y comienza por una acción enzimática, para continuar por una rápida acción bacteriana y procesos oxidativos de los productos de degradación. El aumento de la temperatura ambiente en verano acelera los procesos de descomposición.

Uno de los principales compuestos producidos en su descomposición, son las trimetilaminas, hedor característico del pescado descompuesto.

Las trimetilaminas son compuestos tóxicos de alta volatilidad, por lo que fácilmente escapan al medio ambiente. Su presencia en el pescado en deterioro, es debido a la reducción bacteriana del óxido de trimetilamina, el cual está naturalmente presente en el tejido vivo de muchas especies de pescados marinos. <sup>(1)</sup>

El sábalo es una de las especies de peces de mayor consumo en Bolivia, tiene un mercado nacional importante por el agradable sabor de su carne, además es un alimento básico y fuente de ingresos para quienes lo comercializan.

En el mercado Rodríguez de la ciudad de La Paz existe un buen comercio de pescados, entre ellos encontramos el sábalo que es muy consumido por los habitantes paceños.

Para su venta el sábalo pasa por un previo proceso de descamación, el cual se realiza con un cepillo de madera con clavos, luego se cortan las aletas y la cola. Estos residuos como las escamas, las aletas y la cola, generalmente desechados son fuentes potenciales de compuestos de interés y de un alto grado de importancia.

En algunos estudios realizados se dio a conocer que las escamas de pescado contienen un elevado contenido de colágeno.

En nuestra ciudad actualmente no se produce colágeno a partir de residuos de pescado, estos residuos de pescado pueden ser aprovechados para la obtención de productos de mayor valor, minimizando así los impactos ambientales que generan al ser desechados.

Estos subproductos del sábalo poseen cantidades considerables de colágeno el cual puede extraerse y ser aplicado en la industria cosmética, farmacéutica, para alimentos y también se lo puede utilizar para la elaboración de materiales biomédicos.

El colágeno difiere del resto de proteínas por su cantidad y proporción de aminoácidos, en el colágeno los niveles de glicina, prolina, 4-hidroxiprolina y 5-hidroxilisina son muy superiores a diferencia de otras proteínas. De hecho, la 4-hidroxiprolina se encuentra de manera prácticamente exclusiva en el colágeno.

En el presente trabajo de tipo experimental, se describe la metodología utilizada para la obtención de colágeno, que es nuestro producto principal. También se realiza la aplicación del producto, para el uso de crema cosmética dermatológica.

Con el presente trabajo se pretende reducir el impacto ambiental producido por estos residuos.

### **1.1. ANTECEDENTES**

En la tesis de Nelfa Francisca Mamani Condori 2007, se realizó la producción de colágeno a partir de huesos de llama *Lama glama*, mediante un proceso de extracción por el método ácido. Las unidades productivas de derivados cárnicos (Charque y embutidos) de Llama, producen cantidades considerables de residuos sólidos (huesos), estos residuos no se procesan, algunas veces son desechados sin darle valor agregado. En el proyecto se recomienda para la extracción del colágeno utilizar el método ácido. (2)

En la tesis de Mamani Chambi Sara Fabiola se realiza la, obtención del colágeno en la curtiembre Macubol Ltda, El proyecto de grado tiene como objetivo industrializar la carnaza, que es considerada un residuo y para el proyecto materia prima, evaluando como una nueva alternativa. La carnaza es un insumo de valor por su contenido en proteínas y grasas que pueden utilizarse en diferentes procesos industriales, como en la obtención del colágeno, alimentos para animales, etc. (3)

En la tesis de Espinoza Murga Reina Martha, se realizó la Recuperación del colágeno en la empresa SAMI S.R.L. El objetivo de este proyecto es reducir el grado de contaminación (DBO-5 y DQO) de las aguas residuales modificando la tecnología actual del proceso, sin afectar la calidad del producto terminado y recuperando el colágeno, dentro del marco de lo que es la producción más limpia, para este fin y con la ayuda del (CPTS)-Geología Ambiental y Recursos Naturales GEARENA, se construyó un autoclave a pequeña escala, en el cuál primeramente se realizaron tres diferentes

tipos de cocción del hueso, analizando estas se eligió la opción que satisface la cocción total del hueso, la extracción de grasa y la obtención del lixiviado de colágeno éste fue sometido a diferentes formas de separar el colágeno como tal del agua, analizando éstas se tomó la decisión de concentrar el lixiviado por evaporación, precipitar el colágeno con alcohol etílico y secarlo, así mismo se realizaron dimensionamiento de los equipos para la línea de producción del colágeno y el estudio económico del proyecto. (4)

En la tesis de Ing. Jennifer Carolina Serrano Gaona Colombia, se estandarizó un proceso de extracción y purificación de colágeno ácido soluble a partir de pieles de tilapia *Oreochromis* y de cachama *Piaractusbrachypomus* utilizando análisis estadísticos. (5)

En una investigación de “CIENCIA Y TECNOLOGÍA” de Japón se realizó la preparación y la caracterización del colágeno a partir de las escamas de pescado Los rendimientos de colágenos eran muy altos en una base de peso seco; sardina 50,9%, el besugo 37,5% y la lubina japonesa 41,0%, respectivamente. (6)

En una investigación que se publicó en la revista de “CIENCIA EN NUTRICIÓN Y ALIMENTOS”, se determinó que una gran cantidad de escamas de peces de agua dulce se desechan como residuos, pero la investigación mostró que es posible utilizar las escamas de pescado fresco como una fuente de colágeno Por lo tanto, se debe hacer un uso más eficaz de los limitados recursos, las escamas de pez de carpa pueden ser un recurso potencial para la extracción de colágeno tipo I o gelatina mediante un proceso enzimático. (7)

Sankar S, S Sekar, Mohan R, mostraron que en las escamas de pescado, que son hasta ahora descartados como residuos se encontraron rendimientos considerables de colágeno. Las escamas se recogieron y se limpian a fondo, estas fueron hidrolizados en condiciones ácidas controladas, neutralizados y hechas en a una hoja, es decir, lámina de colágeno de escamas de pescado. El estudio de IR ha demostrado que la hoja contiene ambas fases orgánica e inorgánica que revelan que las escamas están parcialmente desmineralizadas. La resistencia a la tracción es suficiente si se utiliza como un material de apósito para heridas. (8)

En la RED DE REVISTAS CIENTÍFICAS DE AMÉRICA LATINA, se publicó una investigación en la cual se realizó la caracterización parcial del colágeno extraído a partir del manto, aleta y tentáculos de calamar gigante *Dosidicus gigas*, esta extracción se realizó con base a pepsina y sal. En este estudio se comparó el contenido y

algunas propiedades fisicoquímicas de colágeno soluble en pepsina, e insoluble, extraídos de manto, aleta y tentáculos de *Dosidicus gigas* fresco. (9)

En una revista técnica de ingeniería de la Universidad de Zulia, se realizó un estudio de la obtención purificación y liofilización del colágeno de pieles de bovino, puerco y tendones de bovino, se sometieron las pieles a un proceso de encalado, para desintegrar las materias albuminoideas, para después separar la capa externa que es abundante en queratina de la interna que es la portadora de colágeno, esta última se molió y se sometió a la extracción de la proteína, los tendones fueron molidos y homogenizados con 0.2 M de NaCl, con el objetivo de establecer rendimiento de extracción, pureza, y deshidratación del producto por liofilización. (10)

No se encontraron datos bibliográficos de la extracción de colágeno a partir de escamas de pescado, realizados en La Paz.

## **1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El sábalo tiene un mercado nacional importante por lo apetitoso de su carne, aproximadamente es de 9000 (Tn/Año), siendo los mercados más importantes Santa Cruz, Cochabamba, La Paz, Potosí, Tarija y Oruro. (11)

En el departamento de La Paz existen varios puestos de venta de pescados, los mismos que para poder ser consumidos por la población paceña, pasan por un previo proceso el que se separan las escamas de la piel, luego se cortan las aletas y la cola del pescado.

Esta actividad genera grandes cantidades de desperdicios ya que las escamas, aletas y colas son desechadas a la basura sin darles ningún tipo de utilidad posterior, convirtiéndose en basura y un foco de infecciones al final del día. Debido a esto nace la necesidad de buscar nuevas alternativas para extraer colágeno de las escamas de pescado.

Gran parte del colágeno utilizado en la industria farmacéutica, cosmética y de biomateriales es importado del continente europeo, lo cual se ve reflejado en los altos costos de los productos que utilizan esta proteína como principio activo. Debido a que estas industrias están en constante desarrollo y expansión, es de gran importancia tener un proveedor a nivel nacional que permita la reducción de costos. Esto sería posible si se lograra obtener una fuente importante de colágeno que sea de fácil acceso y de constante producción.

### **1.3. JUSTIFICACIÓN**

La necesidad de dar un buen uso a las escamas, aletas y cola de sábalo que resultan del uso del mismo pescado en la ciudad de La Paz, ya que estos residuos no tienen ningún tratamiento posterior, convirtiéndose en basura al final del día. Este es un gran desperdicio ya que estos residuos son una alta fuente proteína.

Estos residuos pueden ser utilizados como materia prima para la obtención de colágeno mediante una metodología experimental, con esto consideramos que es posible generar un mayor valor a la cadena productiva pesquera.

La obtención de la materia prima es gratuita ya que se la recolecta del mercado y en el primer paso previo a la obtención del producto se utiliza agua común para realizar la extracción, esto hace que el proyecto sea de bajo costo económico lo que ayuda a su desarrollo.

Adicionalmente, el aislamiento y producción de estas nuevas sustancias, como esta materia prima, permiten el desarrollo de nuevas industrias como la farmacéutica y la de productos cosméticos

La investigación en dichas áreas es de gran importancia, pues estos centros se enfocan principalmente en temas como: el envejecimiento la desaparición de cicatrices y manchas en la piel. Estas investigaciones dependen en parte de la disposición de colágeno ya que este es uno de los principios activos en los productos utilizados en la regeneración celular.

Debido a la posibilidad de utilizar estos desechos para la producción de colágeno, consideramos que este proyecto será de gran impacto ya que permite obtener el producto mediante un nuevo método de bajo costo, además por el aporte a la protección del medio ambiente el cual es de gran importancia en el proyecto ya que contribuye a la liberación de un problema diario en la ciudad de La Paz generando alternativas accesibles.

### **1.4. OBJETIVOS**

#### **1.4.1. OBJETIVO GENERAL**

- ◆ Recuperar mediante una metodología experimental, el colágeno presente en los desechos de sábalo "*Prochilodus lineatus*" (escamas y aletas) producidos en la ciudad de La Paz.

#### 1.4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ◆ Extraer el colágeno de los desechos de sábalo utilizando métodos que involucran la química verde.
- ◆ Separar el colágeno por medio de una extracción sólido - líquido.
- ◆ Identificar el colágeno por los métodos de espectroscopia IR, RMN y también mediante pruebas cualitativas.
- ◆ Realizar una derivación, por medio de una reacción de acetilación para caracterizar el colágeno.
- ◆ Determinar la estructura molecular del derivado acetilado, mediante el método de espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear.
- ◆ Determinar su potencial aplicación en el uso de cremas dermatológicas.



## CAPITULO II

### 2. MARCO TEORICO

#### 2.1. MATERIA PRIMA

Escamas, aletas, cola del pescado sábalo. *Prochilodus lineatus*.

#### 2.2. GENERALIDADES

Orden: Characiformes

Familia: Prochilodontidae

Nombre común: Conocido como sábalo *Prochilodus lineatus*



Posible sobreexplotación de la especie durante las migraciones de reproducción.

##### 2.2.1. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Se distribuye en Bolivia, Paraguay y Argentina y probablemente en Brasil. En Bolivia se encuentra en Tarija y Chuquisaca posiblemente también en Santa Cruz, ocupa la cuenca del río Paraná, Pilcomayo, río Bermejo y cuenca del Mamoré.

##### 2.2.2. BIOLOGÍA Y ECOLOGIA

Realizan migraciones anuales de reproducción, el pico de las migraciones ocurre en julio, agosto, pero puede extenderse desde mayo hasta la mitad de septiembre, las migraciones de descenso ocurren en noviembre, diciembre, asociadas al periodo de

aguas altas. Se ha estimado que estas migraciones comprenden aproximadamente 900 Km.

Los machos alcanzan tallas de hasta 52 cm (longitud total), las hembras alcanzan tallas menores, probablemente debido a una mayor longevidad de las hembras.

### **2.2.3. USO DE LA ESPECIE**

Esta especie es utilizada para el consumo humano, en los últimos años se ha producido un descenso en la pesca, pero es una de las especies comerciales más importantes. Se conocen cifras máximas de explotación de 550000 Kg en el año 1990.<sup>(12)</sup>

### **2.3. ESCAMAS DE PESADO**

Se define las escamas como “laminas duras, más o menos flexibles, que trazan un gran número de líneas concéntricas y de estrías radicadas superpuestas como las tejas de un tejado” formadoras del exoesqueleto de los peces.

Las escamas de pescado químicamente están compuestas principalmente por fibras de colágeno y por hidroxapatitas,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  que son sales de fosfato de calcio, son el principal componente mineral de los huesos de los vertebrados y razón por la cual una de sus principales aplicaciones está en el campo de los biomateriales, como reparador de tejidos duros y en la fabricación de implantes. <sup>(13)</sup>

En la **Fotografía 1**. Observamos las escamas de pescado.



**Fotografía 1:** Escamas de pescado Sábalo.

### **2.4. QUÍMICA VERDE**

En la actualidad, existe un enorme deterioro del medio ambiente que ha generado la necesidad de buscar alternativas que conduzcan a la sostenibilidad ambiental. Una de estas herramientas es la “química verde”, concepto que contempla el diseño de

productos y procesos que reduzcan la generación de sustancias peligrosas y maximicen la eficiencia en la utilización de recursos materiales y energéticos.

El empleo de tecnologías menos contaminantes, permitirá a las empresas químicas mitigar los efectos ambientales asociados a su actividad, reduciendo el consumo de materiales e incrementando la participación de recursos renovables.

#### **2.4.1. APLICACIONES DE LA QUÍMICA VERDE**

El reto de la sostenibilidad del Planeta, está en encontrar nuevas tecnologías y procesos ambientales responsables, imprescindibles para la fabricación de productos que requiere la sociedad. Los procesos químicos industriales necesitan compuestos y materiales que intervienen en la vida cotidiana y que repercuten en el entorno. Durante décadas, estos aspectos no se tuvieron en cuenta, pero en la actualidad todos los procesos deben ser diseñados con metodologías que prevengan la contaminación y sean seguras para los seres humanos y para el ambiente.

Recientemente, se ha demostrado que la química verde puede utilizar materiales compatibles con el entorno, desarrollando procesos innovadores que reduzcan y/o eliminen la generación de sustancias peligrosas, residuos y tóxicos persistentes provenientes de diversas actividades.

El uso de rutas alternativas para la síntesis de compuestos, es una de las herramientas que utiliza la industria química para reducir la emisión de sustancias contaminantes al ambiente, mejorando la calidad de vida de personas que podrían verse afectadas. Algunas incorporan procesos naturales como la síntesis fotoquímica y biocinética, el uso de materias primas inocuas y renovables, condiciones de reacción alternas, empleando solventes inofensivos para la salud y el ambiente, utilización catalizadores que pueden ser fácilmente recuperados y reutilizados. De este modo, se incrementa la selectividad de las reacciones, disminuyendo o suprimiendo los residuos y las emisiones contaminantes. La selección adecuada de las herramientas de síntesis es fundamental y determinante para la selectividad, reactividad química e incremento de la eficacia.

Uno de los principios de la química verde propone el uso de solventes benignos, que no sean inflamables, tóxicos y no produzcan emisiones de compuestos orgánicos volátiles derivados de su uso como medio de reacción en la industria química y farmacéutica, con el fin de minimizar la producción de contaminantes y subproductos. Por otra parte, la aplicación de tecnologías catalíticas que reduzcan la producción de residuos líquidos o sólidos, o su purificación, proporciona una fácil separación del

producto, eliminando la necesidad de utilizar métodos de separación como la destilación o la extracción.

A pesar de todos estos avances, el desarrollo de métodos químicos verdes no sólo requiere de menos contaminación y residuos, sino también de cambios que proporcionen beneficios en términos del impacto ambiental global. El reto no es sólo usar sustancias verdes durante los procesos sino además, crear productos más amigables con el ambiente y que puedan sustituir los actuales, además de ser diseñados de tal forma que después de cumplir su función, no persistan en el ambiente y se degraden a compuestos inocuos. <sup>(14)</sup>

#### 2.4.2. PRINCIPIOS DE LA QUÍMICA VERDE

1. La prevención de formación de residuos en lugar de remediación.
2. Economía atómica.
3. La reducción de productos químicos tóxicos/peligrosos.
4. La generación de productos eficaces pero no tóxicos.
5. La reducción del uso de solventes volátiles y tóxicos, y de sustancias auxiliares.
6. La disminución en el consumo energético.
7. La utilización de materias primas renovables.
8. La reducción del número de etapas de los procesos de síntesis y en concreto de las reacciones de derivatización.
9. La potenciación de la catálisis lo más selectiva posible, en lugar de reactivos estequiométricos.
10. La generación de productos biodegradables.
11. El desarrollo de metodologías analíticas para la prevención de la contaminación.
12. La minimización del riesgo de accidentes químicos. <sup>(15)</sup>

En la **Figura 1**. se observa el esquema, en el cual se indican las características principales que abarca la Química Verde.

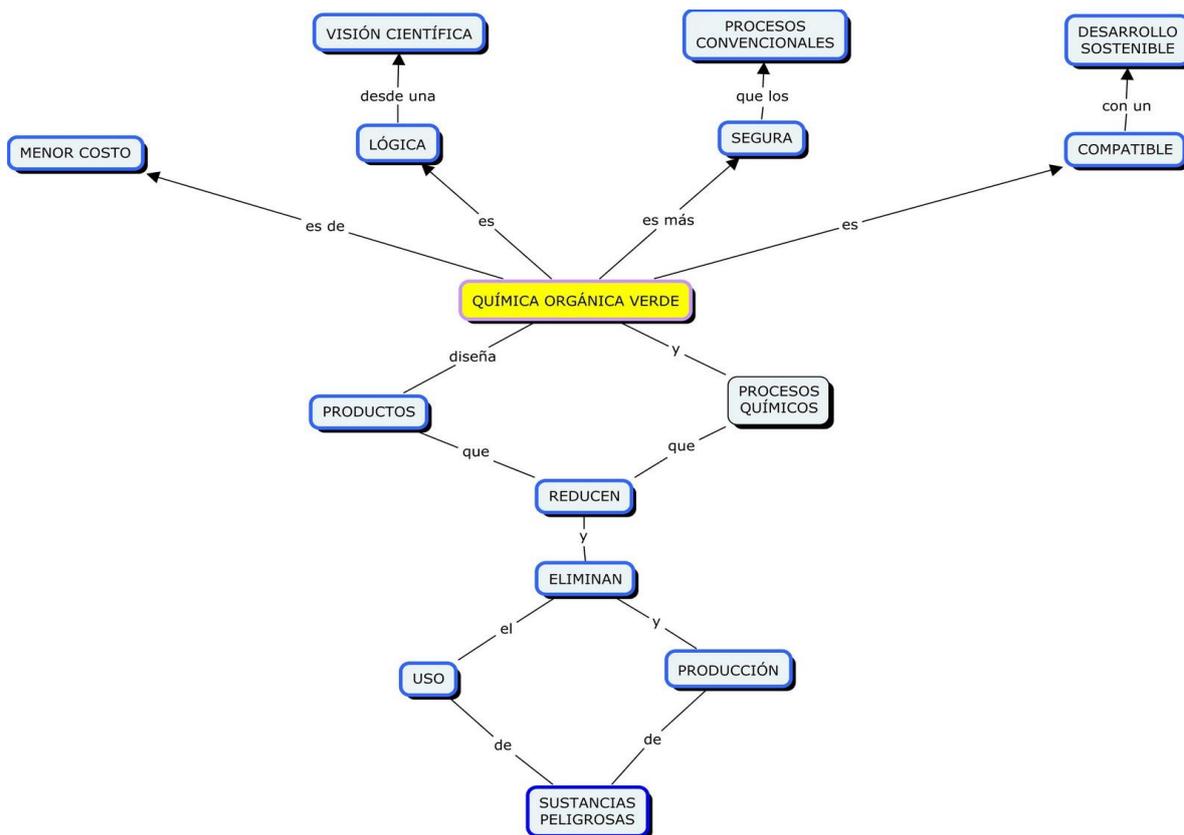


Figura 1: Características de la Química Verde (16)

## 2.5. AMINOÁCIDOS Y PROTEÍNAS

El nombre proteína proviene de la palabra griega *proteicos*, que significa lo primero. Este nombre está bien elegido. Entre todos los compuestos químicos, ciertamente hay que considerar a las proteínas como las más importantes, puesto que son las sustancias de la vida.

Las proteínas constituyen gran parte del cuerpo animal: lo mantienen como unidad y lo hacen funcionar. Se las encuentra en toda célula viva. Son el material principal de la piel, los músculos, tendones, nervios y la sangre, enzimas, anticuerpos y muchas hormonas. (Sólo los ácidos nucleídos que controlan la herencia pueden desafiar la posición de las proteínas. Además, aquellos dirigen la síntesis de éstas).

Desde un punto de vista químico, las proteínas son polímeros grandes. Son poliamidas, y los monómeros de los cuales derivan son los ácidos  $\alpha$ -aminocarboxílicos una sola molécula proteica contiene cientos, e incluso miles, de unidades de aminoácidos, que pueden ser de unos 20 tipos diferentes. El número de combinaciones distintas, es decir, el número de moléculas proteínicas diferentes que

pueden existir, es casi infinito. Es probable que se necesiten decenas de miles de proteínas diferentes para formar y hacer funcionar un organismo animal de tipo distinto.

### 2.5.1. COMPOSICIÓN DE AMINOÁCIDOS EN LAS PROTEÍNAS

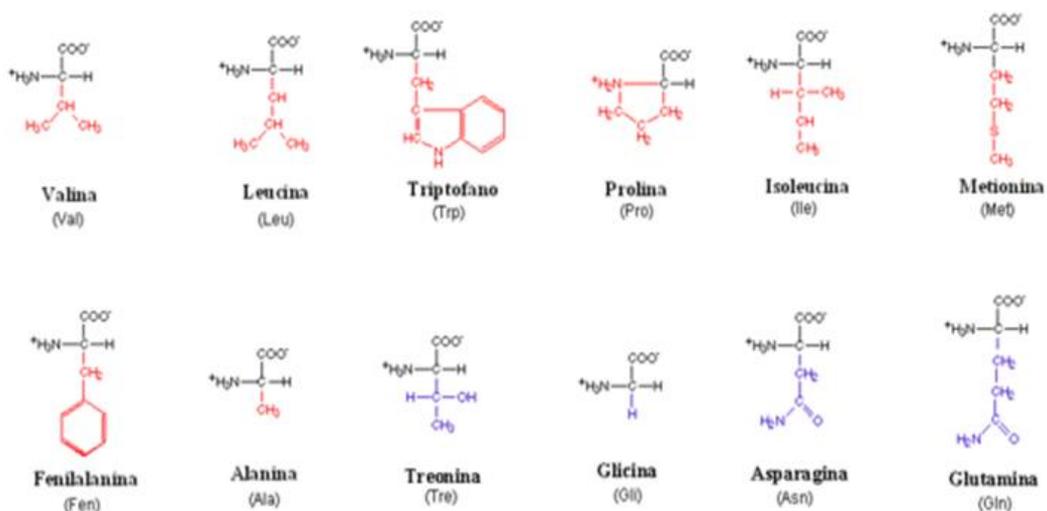
Así como los monosacáridos son las unidades básicas de los polisacáridos, los aminoácidos son las unidades estructurales de las proteínas, es decir, los “ladrillos” con los que se construye la casa proteica.

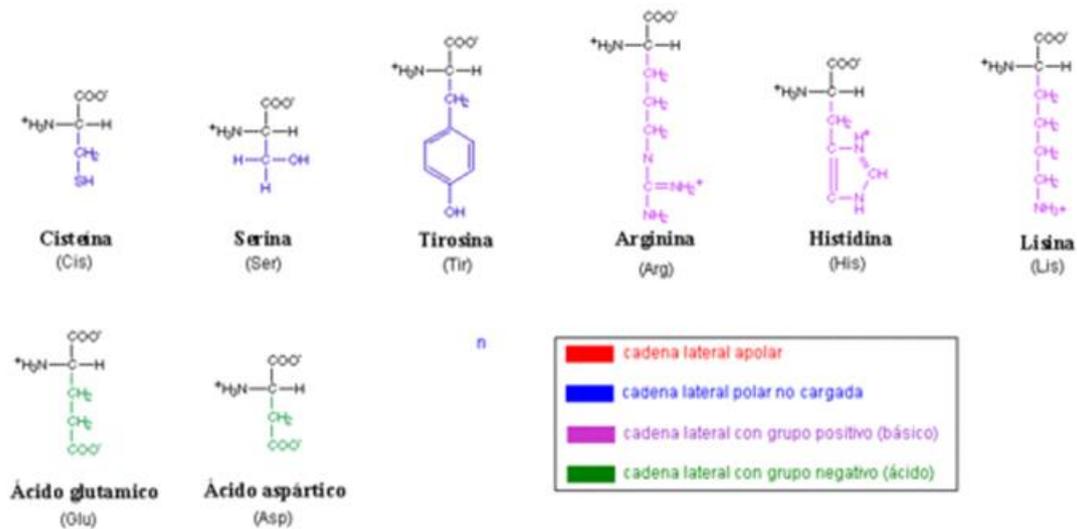
Los polisacáridos usualmente están hechos de unidades de pocos monosacáridos, en cambio las proteínas contienen hasta 22 aminoácidos diferentes.

### 2.5.2. ESTRUCTURA DE LOS AMINOÁCIDOS

Los aminoácidos (aa) son moléculas orgánicas pequeñas con un grupo amino (**NH<sub>2</sub>**) y un grupo carboxilo (**COOH**). La gran cantidad de proteínas que se conocen están formadas únicamente por 20 aa diferentes. Se conocen otros 150 que no forman parte de las proteínas.

Existen más de 200 aminoácidos diferentes, solo cerca de una décima parte de ellos forman parte de las proteínas. En la **Figura 2**, se observan las estructuras químicas de los aminoácidos encontrados en las proteínas.





**Figura 2:** Estructura de los Aminoácidos (17)

Puede observarse que todos estos ácidos son alfa-aminocarboxílicos. En dos casos (prolina e hidroxiprolina), el grupo amino forma parte de un anillo pirrolidínico. Esta característica común les confiere un conjunto de propiedades químicas que también les son comunes, entre las que destaca su capacidad para formar largas cadenas poliamídicas, características de proteínas. Se centrará la atención en estas propiedades comunes.

En otros aspectos, las estructuras de estos compuestos varían considerablemente.

Además del grupo carboxílico y del grupo amino *alfa* con respecto a aquél, algunos de estos aminoácidos tiene un segundo carboxilo estos se denominan aminoácidos ácidos. Otros contiene un segundo grupo básico que puede ser amino (lisina), o el anillo imidazol (histidina). Estos se denominan aminoácidos básicos. (18)

### 2.5.3. PROTEÍNAS

Las proteínas son polímeros de condensación de los aminoácidos, algunas proteínas contienen cientos de aminoácidos, y en algunos casos miles, en estructuras de cadenas altamente organizadas. La polimerización de los aminoácidos se hace con la formación de enlaces peptídicos (amida), al unirse el grupo carboxilo del ácido de un aminoácido con el grupo amino del siguiente aminoácido y produciendo una molécula de agua. Por eso, la unión de varios aminoácidos origina los oligopéptidos y polipéptidos.

### **2.5.3.1. ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS**

Todas las proteínas son polímeros, y los  $\alpha$ -aminoácidos son los monómeros que se combinan para formarlas. Es de nuestro especial interés la prolina, un aminoácido cíclico, que posee características similares a los aminoácidos alifáticos como la alanina y la glicina. La prolina tienen la capacidad de modificarse químicamente una vez se ha ensamblado en las proteínas, para convertirse en 4-hidroxiprolina.

Las moléculas proteicas poseen cuatro niveles de organización estructural: primaria (secuencia), secundaria (plegado local), terciaria (plegado global) y cuaternaria (asociación de varias cadenas).

En el primer nivel de organización, la secuencia de aminoácidos, viene dada por la secuencia de DNA del gen para cada proteína. La estructura primaria es fundamental para la forma tridimensional que tendrá la proteína. Cualquier modificación en la secuencia de aminoácidos podría ocasionar un cambio en la estructura tridimensional y afectará la función biológica de la proteína.

A medida que la cadena de aminoácidos se va ensamblando, empiezan a tener lugar interacciones entre los diversos aminoácidos de la cadena. Pueden formarse puentes de hidrógeno entre el hidrógeno del amino de un aminoácido y el oxígeno del carboxilo de otro. A causa de estas uniones la cadena polipeptídica se pliega, adoptando dos posibles configuraciones espaciales que constituyen lo que se conoce como estructura secundaria de una proteína. Estas dos configuraciones son las llamadas  $\alpha$ -hélice y  $\beta$ -hoja plegada. (19)

### **2.5.4 PROPIEDADES CARACTERÍSTICAS DE LAS PROTEÍNAS.**

#### **2.5.4.1 CAPACIDAD AMORTIGUADORA**

Las proteínas tienen un comportamiento anfótero y esto las hace capaces de neutralizar las variaciones de pH del medio, ya que pueden comportarse como un ácido o una base y por tanto liberar o retirar protones ( $H^+$ ) del medio donde se encuentran.

#### **2.5.4.2 SOLUBILIDAD**

Las proteínas son solubles en agua cuando adoptan una conformación globular. La solubilidad es debida a los radicales (-R) libres de los aminoácidos que, al ionizarse, establecen enlaces débiles (puentes de hidrógeno) con las moléculas de agua. Así, cuando una proteína se solubiliza queda recubierta de una capa de moléculas de agua (capa de solvatación) que impide que se pueda unir a otras proteínas lo cual

provocaría su precipitación (insolubilización). Esta propiedad es la que hace posible la hidratación de los tejidos de los seres vivos.

#### **2.5.4.3. DESNATURALIZACIÓN**

La desnaturalización de una proteína se refiere a la ruptura de los enlaces que mantenían sus estructuras cuaternaria, terciaria y secundaria, conservándose solamente la primaria. En estos casos las proteínas se transforman en filamentos lineales y delgados que se entrelazan hasta formar compuestos fibrosos e insolubles en agua. Los agentes que pueden desnaturalizar a una proteína pueden ser: calor excesivo; sustancias que modifican el pH; alteraciones en la concentración; alta salinidad; agitación molecular; etc. El efecto más visible de éste fenómeno es que las proteínas se hacen menos solubles o insolubles y que pierden su actividad biológica. La mayor parte de las proteínas experimentan desnaturalizaciones cuando se calientan entre 50 y 60 ° C, otras se desnaturalizan también cuando se enfrían por debajo de los 10 a 15 ° C. La temperatura a la cual una proteína se desnaturaliza es la temperatura de desnaturalización.

#### **2.5.4.4. ESPECIFICIDAD**

Es una de las propiedades más características y se refiere a que cada una de las especies de seres vivos es capaz de fabricar sus propias proteínas (diferentes de las de otras especies) y, aún, dentro de una misma especie hay diferencias proteicas entre los distintos individuos. Esto no ocurre con los glúcidos y lípidos, que son comunes a todos los seres vivos. La enorme diversidad proteica inter-específica e intra-específica es la consecuencia de las múltiples combinaciones entre los aminoácidos, lo cual está determinado por el ADN de cada individuo.

La especificidad de las proteínas explica algunos fenómenos biológicos como: la compatibilidad o no de trasplantes de órganos; injertos biológicos; sueros sanguíneos; etc., o los procesos alérgicos e incluso algunas infecciones.

### **2.6. USOS Y APLICACIONES DEL COLÁGENO**

El colágeno posee propiedades únicas lo cual le permite ser utilizado en diferentes aplicaciones industriales, como en materiales biomédicos, en la industria farmacéutica, en la industria de cosméticos y en alimentos.

#### **2.6.1. INDUSTRIA ALIMENTARIA**

Para fines industriales el colágeno es desnaturalizado por calentamiento. Esto se llama formación de gelatina.

La gelatina se utiliza en muchos alimentos, incluyendo postres de gelatina con sabor. Además de alimentos, la gelatina se ha utilizado en las industrias farmacéutica, cosmética y fotografía.

La gelatina es una fuente pobre de nutrición y proteínas ya que no contienen todos los aminoácidos esenciales en las proporciones que requiere el cuerpo humano.

Gelatina de pescado es una importante alternativa de gelatina, La propiedad de colágeno y gelatina como de los huesos y escamas de pescado junto con su fácil disponibilidad hacen que sea una fuente potencial de desarrollo en productos de gelatina

También desde hace pocos años el colágeno se ha empezado a introducir en el mercado de los complementos nutricionales de uso oral. Esta aplicación tiene ventajas frente al uso de cremas y lociones ya que el complemento alimenticio penetra hasta las capas más profundas de la piel, gracias a que los aminoácidos que componen el colágeno son absorbidos y utilizados para la regeneración del tejido conjuntivo, en el desarrollo de este producto se ha utilizado el colágeno marino por su mayor disponibilidad en contraposición con el colágeno tradicional.

## **2.6.2. EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA Y COSMÉTICA**

La principal aplicación del colágeno en la industria farmacéutica y cosmética es el tratamiento de arrugas, desaparición de manchas en la piel y el encapsulamiento de medicamentos que facilita la administración y dosificación del mismo.

Tiene gran importancia la aplicación de colágeno, gracias a las bondades que esta proteína tiene. Se ha utilizado para la prevención y tratamiento de arrugas, en la producción de parches para heridas y en el desarrollo de medicamentos con liberación de los principios activos. A partir de los 25 años de edad se va perdiendo colágeno del organismo humano lo que va produciendo señales de envejecimiento. Para disminuir este efecto, se han desarrollado diferentes productos a base de colágeno que permitan detener en cierta medida este proceso o por lo menos retrasarlo. Es así como se han creado productos como cremas, geles, lociones y mascarillas, además de inyecciones subcutáneas para aplicarse directamente en la piel. Como se mencionó anteriormente dicha proteína se encuentra extendida en gran parte del organismo por lo que también hace parte de la salud del cabello, por esto se han desarrollado productos como shampoo, acondicionadores y tratamientos capilares a base de colágeno, que eviten la aparición de signos de debilitamiento.

Respecto al colágeno para el tratamiento de heridas, se han desarrollado productos como parches y apósitos o gasas, los cuales tienen grandes beneficios al momento de la cicatrización. Se ha evidenciado que la fuerza tensil de las cicatrices se aumentó en un 40% y también que acelera la reparación tisular, disminución de la respuesta inflamatoria local, beneficia la capacidad para reducir la carga bacteriana e incentiva la formación de tejido conectivo. (20)

## **2.7. COLÁGENO**

### **2.7.1. EL COLÁGENO ES LA PROTEÍNA MÁS ABUNDANTE EN EL MUNDO ANIMAL**

El colágeno, el principal constituyente de los tejidos conjuntivos, representa aproximadamente 25% de la proteína total de los mamíferos. Proporciona un sistema estructural de sostén extracelular en todos los metazoarios y existe virtualmente, en cada uno de los tejidos animales. Por lo menos 19 tipos distintos de colágeno constituidos por casi 30 cadenas polipeptídicas diferentes entre sí (cada una codificada por un gen separado), han sido identificadas en los tejidos humanos. Aunque muchos de estos colágenos estén presentes en pequeña proporción, pueden desempeñar funciones fundamentales en el desarrollo de las propiedades físicas de tejidos específicos.

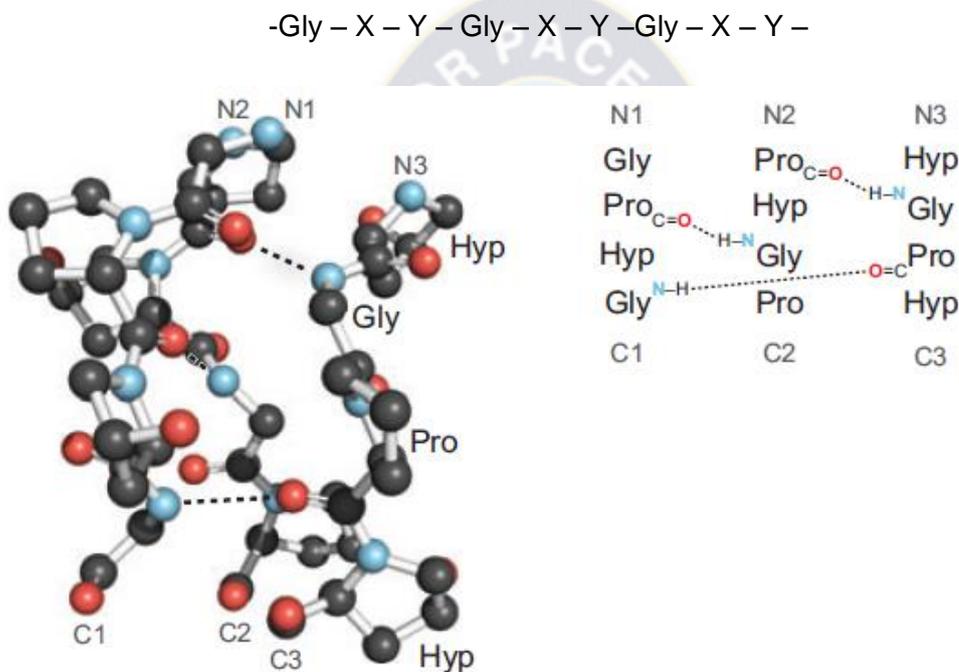
Los 19 tipos de colágeno, pueden subdividirse en un gran número de clases sobre todo según las estructuras que forman.

### **2.7.2. COLÁGENO, UNA PROTEÍNA FIBROSA**

El colágeno es el más abundante de las proteínas fibrosas. Otras proteínas fibrosas sobresalientes son la queratina y la miosina. Estas proteínas representan una fuente primaria de resistencia estructural para las células y los tejidos. La piel obtiene fuerza y flexibilidad de una red entrecruzada de colágeno y de fibras de queratina, en tanto que los huesos y dientes están reforzados por una red subyacente de fibras de colágeno análogas a las varillas de acero en el concreto reforzado. El colágeno también está presente en los tejidos conectivos como los ligamentos y tendones. El alto grado de resistencia a la tensión requerido para cumplir estas funciones estructurales exige proteínas alargadas que se caracterizan por secuencias repetitivas de aminoácidos y una estructura secundaria regular.

### 2.7.3. ESTRUCTURA QUIMICA DEL COLÁGENO

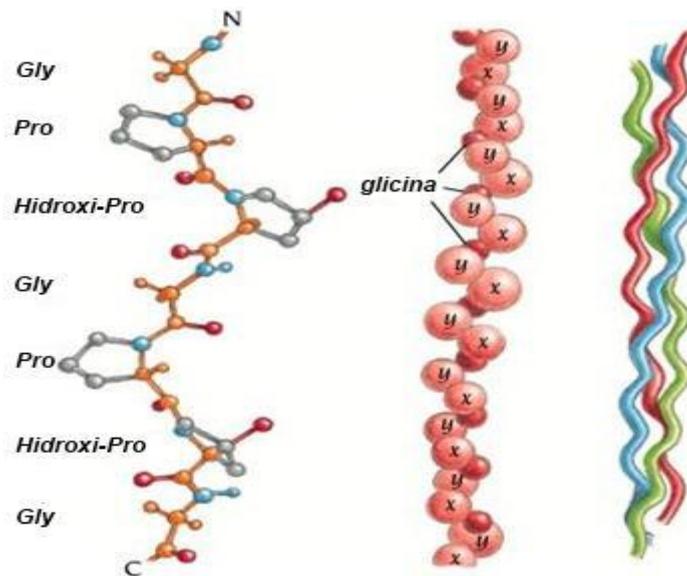
Todos los tipos de colágeno poseen una estructura helicoidal triple. En algunos colágenos la molécula completa es una triple hélice, en tanto que otros poseen la triple hélice solo en parte de su estructura. El colágeno tipo I maduro, compuesto por casi 1000 aminoácidos, pertenece al primer tipo; en este cada subunidad de polipéptido, o cadena  $\alpha$ , gira sobre su eje, formando una hélice orientada hacia la izquierda y en cada giro hay tres residuos. Una característica sobresaliente del colágeno es la presencia de residuos glicina en cada tercera posición en la triple hélice como se observa en la **Figura 3**.



**Figura 3:** Secuencia de aminoácidos en el colágeno

Esto es necesario porque la glicina es el único aminoácido lo suficientemente pequeño como para acomodarse en el limitado espacio disponible a lo largo del hueco central de la triple hélice. Esta estructura repetitiva, representada como (Gly – X – Y –)<sub>n</sub> es un requisito absoluto para la formación de la triple hélice. Mientras que la X y la Y pueden ser cualquier otro aminoácido casi 100 de las posiciones X son ocupadas por prolina, y casi 100 de las posiciones Y son ocupadas por hidroxiprolina. La prolina y la hidroxiprolina confieren rigidez a la molécula de colágeno. La **hidroxiprolina** se forma por la hidroxilación postraduccional de residuos de prolina unidos al péptido, catalizada por la enzima **propilhidroxilasa**, cuyos cofactores son el **ácido ascórbico** (vitamina C) y el  $\alpha$ -cetoglucorato. Las lisinas en posición Y también pueden ser modificadas de manera postraduccional y convertidas a hidroxilisina mediante la acción de la

lisilhidroxilasa, una enzima que utiliza cofactores semejantes. Las fibras de colágeno son estabilizadas mediante la formación de enlaces cruzados covalentes como se muestran en su estructura química en la **Figura 4**. dentro y entre cada unidad de triple hélice. (19)



**Figura 4:** Estructura química del colágeno

## 2.8. ACETILACIÓN DEL COLÁGENO

Las proteínas están constituidas por cadenas peptídicas, es decir por residuos de aminoácidos unidos entre sí por uniones amídicas, la estructura peptídica de las proteínas está indicada por muchos tipos de pruebas: la hidrólisis de proteínas con ácidos, bases o enzimas genera péptidos y, finalmente aminoácidos. (18)

La acetilación consiste en una reacción que introduce un grupo acetilo en un compuesto químico. Este proceso de transferencia del grupo acetilo (que resulta en un grupo acetoxi) a un compuesto, debe implicar la sustitución del grupo acetilo por un átomo de hidrógeno. Una reacción que implique la sustitución de dicho átomo de hidrógeno de un grupo hidroxilo con un grupo acetilo ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ) genera un éster específico, el acetato. El anhídrido acético es comúnmente usado como agente de acetilación con grupos hidroxilo libres. A partir de la composición conocida de colágeno es evidente que muchos de los aminoácidos su cadena lateral deben distinguirse por grupos polares, de los cuales los más importantes son carboxilo, amino, guanidino y grupos hidroxilo alifático.

El grupo acetilo se asocian al extremo N-terminal en una proteína. Los grupos acetilo en proteínas pueden estar unidos a ya sea oxígeno o nitrógeno, y en general se cree

que las dos formas de combinación se pueden diferenciar por su estabilidad alcalina. La N-acetilación es completa en pocas horas en las condiciones adecuadas; O-acetilación se vuelve apreciable sólo cuando las proporciones de ácido y anhídrido son del mismo orden, y requiere más de 4 días para su finalización. (21)

## **2.9. FUENTES DE OBTENCIÓN**

Los residuos de la piel, huesos y cartílagos bovinos y porcinos representan hoy en día la principal fuente de extracción de colágeno en la industria. Pero una de las dificultades que presenta este tipo de colágeno es que no puede cubrir todos los mercados debido a limitaciones socio-culturales. Además el costo de obtención de colágeno a partir de bovinos y porcinos es elevado, debido al alto valor que tiene la cría de este tipo de animales y la baja productividad que se puede obtener de colágeno.

La problemática anterior ha obligado a la búsqueda de fuentes alternativas de materia prima para la obtención de colágeno, entre las estudiadas se encuentran, las patas de las aves, la piel bovina, el tendón de los equinos, la piel del sapo, las escamas de pescado, las medusas, la piel porcina, la piel del tiburón y la piel de los pollos . (22)

### **2.9.1. COLÁGENO EN ORGANISMOS TERRESTRES**

El colágeno generalmente constituye del 20 al 25% de la proteína total de los vertebrados superiores y alrededor de un tercio o más del cuerpo humano. Se dice que cuanto más pesado sea un animal, más colágeno posee. Por ejemplo, una vaca mantiene su forma debido al colágeno presente en su pellejo, tendones, huesos y otros tejidos conjuntivos. Al menos cuatro tipos de colágeno (I, III, IV y V) se han identificado en músculos de mamíferos y aves; en animales de ganado y cerdos se ha encontrado que contienen primariamente colágeno tipo I de composición  $[\alpha_1(I)2\alpha_2(I)]$  y tipo III  $[\alpha_1(III)]$ . Por otro lado, el colágeno presente influye significativamente en la textura del músculo, ya que en animales jóvenes es más inestable debido a que los puentes de hidrógeno que los unen están en menor número. En cambio, en animales maduros, el colágeno posee un mayor número de puentes de hidrógeno (que se forman con el tiempo) y por lo tanto una mayor estabilidad.

### **2.9.2. COLÁGENO EN ORGANISMOS ACUÁTICOS**

El contenido de colágeno en los organismos marinos es menor que en los mamíferos, variando del 1 al 12% de la proteína y del 0.2 al 2.2% del peso del músculo. Se ha demostrado que juega un papel importante en el mantenimiento de la estructura del

músculo y está estrechamente relacionado con la capacidad natatoria de los peces quizá debido a que es el mayor contribuyente de la fuerza tensil del músculo.

Los organismos acuáticos son heterogéneos en composición, el tipo de colágeno presente en estos y sus características varían de especie a especie. Sin embargo, se ha demostrado que el colágeno tipo I y V frecuentemente forman parte del tejido conectivo de los organismos marinos. Estos factores sugieren que las especies moleculares del colágeno y su distribución en los organismos acuáticos son diferentes al de los músculos de aves y mamíferos.

### 2.9.2.1. PROPIEDADES DEL COLÁGENO DE ORGANISMOS ACUÁTICOS

En sí, los atributos de los músculos de animales terrestres y acuáticos difieren en gran medida de acuerdo a su composición química. En análisis realizados al colágeno proveniente de pescados comúnmente utilizados para la producción de gelatina, se ha encontrado que la distribución de aminoácidos es similar al proveniente de los mamíferos, pero con menores cantidades de prolina e hidroxiprolina y altos valores de serina, treonina, y en algunos casos metionina.

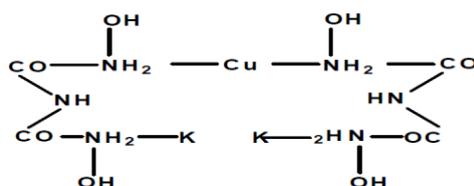
Así mismo en un análisis donde se compararon las propiedades del colágeno tipo I del gran tiburón azul (*Prionace glauca*) y las del colágeno de cerdo, se encontró que el colágeno proveniente del tiburón presenta una menor temperatura de desnaturalización lo cual se relaciona con el menor contenido de iminoácidos. (23)

## 2.10. TECNICAS ANALITICAS DE IDENTIFICACION

### 2.10.1. PRUEBAS CUALITATIVAS

#### 2.10.1.1. PRUEBA DE BIURET

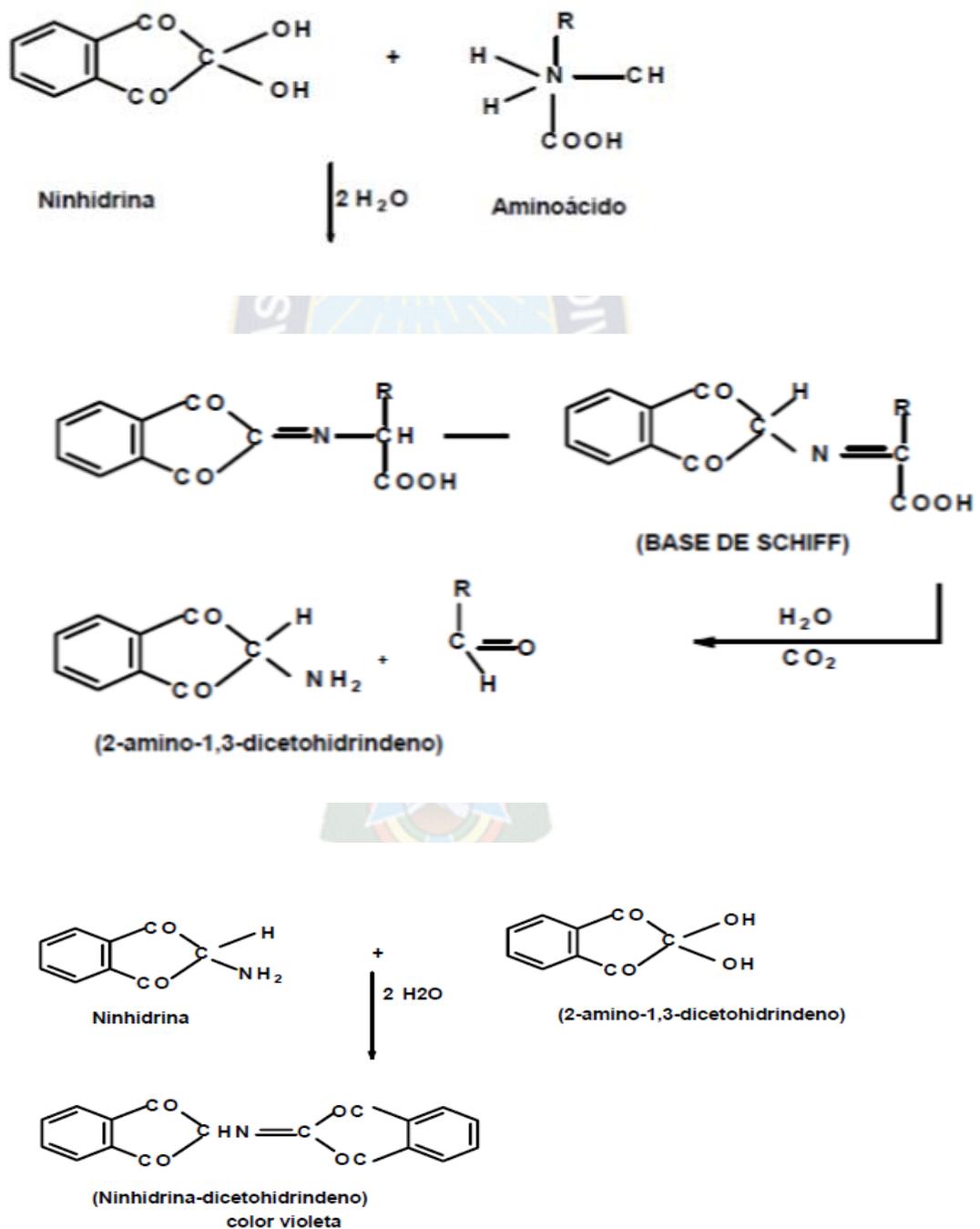
Esta reacción que se muestra en la **Figura 5**, es característica para aquellos compuestos que poseen dos o más enlaces peptídicos. La denominación "Biuret" se debe a que el compuesto orgánico Biuret también da positiva a esta reacción. La reacción de Biuret se basa en las formaciones en medio alcalino, de un complejo de coordinación de color violeta entre el ion cúprico ( $\text{Cu}^{+2}$ ) y 4 átomos de hidrogeno, provenientes de las cadenas peptídicas.



**Figura 5:** Reacción de la prueba de Biuret

### 2.10.1.2. PRUEBA DE NINHIDRINA

Esta es una reacción general para cualquier aminoácido y es debido a la presencia del grupo amino ( $\text{NH}_2$ ) de manera de que todos los alfa aminoácidos y por supuesto las proteínas dan positiva a esta reacción. No obstante cualquier sustancia proteica que contenga un grupo alfa ( $\text{NH}_2$ ) también da positiva a esta reacción, la reacción se efectúa en tres etapas como se muestra en la **Figura 6**. (24)



**Figura 6:** Reacción de la prueba de Ninhidrina (24)

## **2.10.2. ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR RMN**

La espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN) representa básicamente otra forma de espectrometría de absorción, semejante a la espectrometría infrarroja o ultravioleta. Bajo condiciones adecuadas, una muestra puede absorber radiación electromagnética en la región de radio frecuencia a frecuencias gobernadas por las características de la muestra.

Es la técnica que mayor información estructural proporciona. Esto se debe a que se observan los núcleos de los átomos y se puede conocer la influencia de cada entorno molecular sobre cada uno de los átomos

Los átomos más abundantes en los compuestos orgánicos, H y C, se pueden observar fácilmente con cantidades no muy grandes de muestra. Puesto que en cada caso se pueden sacar conclusiones sobre el entorno próximo a cada átomo, se puede llegar a deducir la estructura de dichos compuestos

La absorción es función de ciertos núcleos en la molécula. Una gráfica de las frecuencias de picos de absorción en función de las intensidades de pico es lo que constituye el espectro de RMN.

### **2.10.2.1. ESPECTROMETRÍA DE RMN DEL PROTON $^1\text{H}$**

Habitualmente, en un espectro de RMN de protón los desplazamientos químicos aparecen en el intervalo 0 -10 ppm. Su valor exacto, depende del entorno químico de cada núcleo. Los protones con un mismo entorno químico se dice que son químicamente equivalentes y resuenan al mismo desplazamiento químico por lo que dan lugar a una sola señal en el espectro. La equivalencia química de los protones de un determinado compuesto está relacionada estrechamente con su grado de simetría. Los protones equivalentes deben ser intercambiables entre si mediante una operación de simetría (plano de simetría, centro de simetría o rotación).

La equivalencia o equivalencia de los protones de una molécula se puede determinar reemplazando de forma secuencial cada uno de los átomos de hidrogeno a estudiar por un sustituyente Z. Si se obtiene el mismo producto independientemente de que protón se haya sustituido estos son químicamente equivalentes.

### **2.10.2.2. ESPECTROMETRÍA DE RMN DEL $^{13}\text{C}$**

Aunque se trata de la misma técnica, las características de los espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  difieren notablemente de las de los espectros de protón. Esto es debido principalmente a que el carbono 13 se encuentra en muy baja abundancia.

El  $^{13}\text{C}$  tiene un spin nuclear de  $\frac{1}{2}$  y puede observarse por RMN a la frecuencia de 10.705 MHz a un campo de 10 kilogauss. El análisis: está limitado por lo siguiente: la abundancia relativa del  $^{13}\text{C}$  a tan solo 1.1% (comparado con el  $^{12}\text{C}$ ); la resonancia del  $^{13}\text{C}$  es tan solo 1.6% de la sensibilidad de la resonancia correspondiente al  $^1\text{H}$ , y el campo de relajamiento del  $^{13}\text{C}$  es mayor que para el caso del  $^1\text{H}$ .

Estas limitaciones pueden eliminarse mediante el uso de muestras relativamente grandes. Ya que el número de spin del  $^{13}\text{C}$  es igual que para el  $^1\text{H}$ , se aplican las mismas reglas para la predicción de la multiplicidad de estas absorciones. (25)

### 2.10.3. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

En contraste con la región ultravioleta, donde para la mayoría de los compuestos orgánicos se observan pocos picos de absorción, los espectros infrarrojos proporcionan numerosas bandas de absorción. Muchas de ellas no pueden ser asignadas con exactitud, pero las que pueden proporcionar una vasta información estructural sobre la molécula.

Para medir una determinada absorción infrarroja se utilizan tanto la longitud de onda ( $\mu$ ) como el número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ). La región infrarroja normal se extiende de 2,5 a 15  $\mu$  ( $4000$  a  $667\text{cm}^{-1}$ ); la región de 0,8 a 2,5  $\mu$  ( $12500$  a  $4000\text{cm}^{-1}$ ) se llama cercano infrarrojo y la región de 15 a 200  $\mu$  ( $667$  a  $50\text{cm}^{-1}$ ) se llama lejano infrarrojo. Como sucede en la espectroscopia ultravioleta, las absorciones que ocurren a menores longitudes de onda (alta frecuencia) poseen mayor energía. El número de onda es directamente proporcional a la energía absorbida ( $K = E/hc$ ) y esta es inversamente proporcional a la longitud de onda ( $\lambda = hc/E$ ;  $\lambda = 1/K$ ).

#### 2.10.3.1. VIBRACIÓN MOLECULAR

Una molécula no es una asociación rígida de átomos. Podemos compararla a un sistema en que esferas de diferentes masas representan los átomos de la molécula y resortes de longitudes variables corresponden a los enlaces químicos de la misma.

Hay dos clases fundamentales de vibraciones para las moléculas: de estiramiento, en la cual la distancia entre dos átomos aumenta y disminuye, pero los átomos permanecen en el mismo eje de enlace, y deformación, en la cual la posición de los átomos varía en relación al eje original.

Las vibraciones de estiramiento y de deformación de un enlace ocurren a determinadas frecuencias cuantizadas. Cuando luz infrarroja de la misma frecuencia incide en la molécula se produce absorción de energía y la amplitud de la vibración

aumenta. Cuando la molécula vuelve del estado excitado al estado normal, la energía absorbida es liberada en forma de calor. (26)

### 2.10.3.2. ABSORCION DE GRUPOS FUNCIONALES COMUNES DE UNA PROTEINA

La estructura peptídica de las proteínas esta indica por muchos tipos de pruebas: la hidrolisis de proteínas con ácidos, bases o enzimas genera péptidos y, finalmente, aminoácidos, sus espectros infrarrojos **IR** presentan bandas que son características del grupo AMIDA. (18)

La **Tabla 1** contiene las posiciones de absorción de más fácil interpretación para los grupos funcionales de las amidas y los ácidos carboxílicos.

Grupo	Región $\mu$	Intensidad	Región $\text{cm}^{-1}$
<b>ACIDOS CARBOXILICOS</b>			
<i>Estiramiento del anión carboxilato</i>	7.15 – 7.69	(f)	1400 - 1300
<b>AMIDAS</b>			
a) <i>Vibraciones de estiramiento del Carbonilo</i>			
Secundaria sólida y concentrada	5.95 – 6.14	(f)	1680 – 1630
b) <i>Vibraciones de Estiramiento N-H</i>			
Secundaria, ligada; una banda	3.00 – 3.20	(m)	3320 - 3140
c) <i>Vibraciones de Deformación N-H</i>			
Amida secundaria, solución diluida	6.45 – 6.62	(f)	1550 – 1510

**Tabla 1:** Absorciones características en el infrarrojo de los grupos funcionales (26)

## 2.11. FUNDAMENTO TEÓRICO PARA LA ELABORACIÓN DE UNA CREMA CON COLÁGENO

La piel es una parte muy sensible y pierde colágeno constantemente, por eso es muy importante tener una crema de uso diario que contenga colágeno.

La dermis, la capa interna de la piel, contiene grandes cantidades de colágeno, que se degenera a un ritmo de un 1,5% al año a partir de los 25 años de edad.

Los radicales libres y otros factores internos consecuentes de lo que comemos, fumamos, tomamos, hacemos y factores externos como la sobre exposición al sol, o el uso exceso de jabones y maquillajes, contribuyen al deterioro de nuestra dermis y a la pérdida de las propiedades naturales como el Colágeno que tiene la función de proteger nuestro cuerpo.

El cuidado anti-arrugas ha ido evolucionando con el tiempo, y los productos son cada vez más sofisticados, los laboratorios de investigación han hecho estudios y han aportado soluciones innovadoras para reducir y prevenir las arrugas. Las cremas tradicionalmente para prevenir y tratar las arrugas han incluido antioxidantes como las vitaminas A, C, y E, así como ácidos alfa hidroxilo, sin embargo la ciencia, inspirada en las técnicas de medicina estética utilizada por dermatólogos, ha añadido un extra a estas fórmulas tradicionales, y es así como ahora nos encontramos con cremas creadas que no sólo estimulan la producción de colágeno sino que también lo contienen.

Las cremas de **colágeno** están presentes para ayudar a estimular la producción de colágeno en la piel, como bien sabemos **el colágeno** es una proteína asociada con el crecimiento, mantenimiento y funciones de la piel. La forma más común para añadir el colágeno a estas cremas, es a partir del colágeno que proviene de fuentes bovinas o de algunos peces, esta proteína coadyuva a mejorar la firmeza y elasticidad de la piel

La **crema de colágeno** no es en sí lo único para tratar las arrugas en la piel, esto también debe complementarse con una adecuada alimentación así como con un estilo de vida saludable, lo que en conjunto con una crema de **colágeno** podrá devolver la firmeza y luminosidad al rostro. (27)

### 2.11.1. PROPIEDADES COSMÉTICAS DEL COLÁGENO

- ✓ Es una proteína que de manera natural se encuentra en el cuerpo y es un medio efectivo para revitalizar la piel, quitar años y corregir imperfecciones.

- ✓ Desvanece arrugas y regenera ciertas zonas del rostro
- ✓ Crea un capa que se detiene en la superficie de la dermis reafirmando y humedeciendo la piel.

### 2.11.2. CONCEPTOS BÁSICOS PARA ELABORAR UNA CREMA

Una crema se compone de tres fases:

- ✓ **FASE ACUOSA:** Es la parte líquida. Agua de rosas, agua destilada etc.
- ✓ **FASE OLEOSA:** Es la parte grasa. Aceites, manteca, emulsionantes.
- ✓ **ACTIVOS:** Son los principios activos, conservantes y antioxidantes. Colágeno, elastina, ácido hialurónico, retinol, vitaminas, protector solar etc. Es decir, aquí se pondría todo lo que no forma parte de las dos fases anteriores. (28)

### 2.11.3. COMUNIDAD ANDINA DE NACIONES DECISION No. 516

Armonización de legislaciones en materia de productos cosméticos.

#### 2.11.3.1. NOTIFICACION SANITARIA OBLIGATORIA

##### INFORMACIÓN TÉCNICA

- ✓ La descripción del producto con indicación de su fórmula cualitativa. Adicionalmente se requerirá la declaración cuantitativa para aquellas sustancias de uso restringido y los activos que se encuentren en normas con parámetros establecidos para que ejerzan su acción cosmética, así no tengan restricciones.
- ✓ Nomenclatura Internacional o genérica de los ingredientes (INCI).
- ✓ Especificaciones organolépticas y fisicoquímicas del producto terminado.
- ✓ Especificaciones microbiológicas cuando corresponda, de acuerdo a la naturaleza del producto terminado.
- ✓ Justificación de las bondades y proclamas de carácter cosmético atribuibles al producto, cuya no veracidad pueda representar un problema para la salud.
- ✓ Deberá tenerse en cuenta que en dicha justificación no se podrán atribuir efectos terapéuticos a los productos cosméticos.
- ✓ Proyecto de arte de la etiqueta o rotulado.
- ✓ Instrucciones de uso del producto, cuando corresponda.
- ✓ Material del envase primario. (29)

## CAPITULO III

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1. PROCEDIMIENTO

En esta parte se describirá el procedimiento del ensayo a seguir, desde la recolección de la materia prima hasta la caracterización del producto final para la obtención de colágeno y su potencial aplicación cosmetológica.

#### 3.2. EQUIPOS Y REACTIVOS

##### 3.2.1. UNIVERSO DE TRABAJO

“Laboratorio de Productos Naturales” Síntesis y Hemisíntesis, Carrera de ciencias Químicas, Facultad de Ciencias Puras y Naturales. “Laboratorio de Química Industrial” Facultad de Tecnología.

##### 3.2.2. EQUIPOS DE LABORATORIO

- ✓ Cocina a gas
- ✓ Olla presión  
Capacidad 3.2 litros  
Presión 72 Kpa
- ✓ Refrigerador
- ✓ Balanza Analítica
- ✓ Espátula
- ✓ Soporte universal
- ✓ Agitador Magnético
- ✓ Estufa
- ✓ Campana de gases
- ✓ Rotaevaporador
- ✓ Phimetro
- ✓ Espectrofotómetro I.R.
- ✓ Resonancia Magnética Nuclear

##### 3.2.3. CRISTALERÍA

- ✓ Balón 50 ml
- ✓ Refrigerante liebing
- ✓ Probeta 100 ml, 50 ml
- ✓ Erlenmeyer de 250 ml
- ✓ Vasos de precipitado de 250, 100, y 50 ml
- ✓ Embudo de separación 250 ml
- ✓ Embudo analítico
- ✓ Tubos de ensayo con capacidad de 5 ml
- ✓ Gradilla para tubos de ensayo
- ✓ Pinza de madera
- ✓ Varilla de vidrio
- ✓ Pipetas de 10, 5, y 1 ml

##### 3.2.4. REACTIVOS

- ✓ Preparación del extracto
- ✓ Metabisulfito de sodio
- ✓ Anhídrido acético
- ✓ Piridina
- ✓ Acetato de etilo
- ✓ Sulfato de cobre
- ✓ Hidróxido de sodio
- ✓ Ninhidrina
- ✓ p-dimetilbenzaldehido
- ✓ Ácido clorhídrico
- ✓ Agua destilada
- ✓ Algodón
- ✓ Papel filtro

### 3.3. DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCESO DE OBTENCION DE COLÁGENO

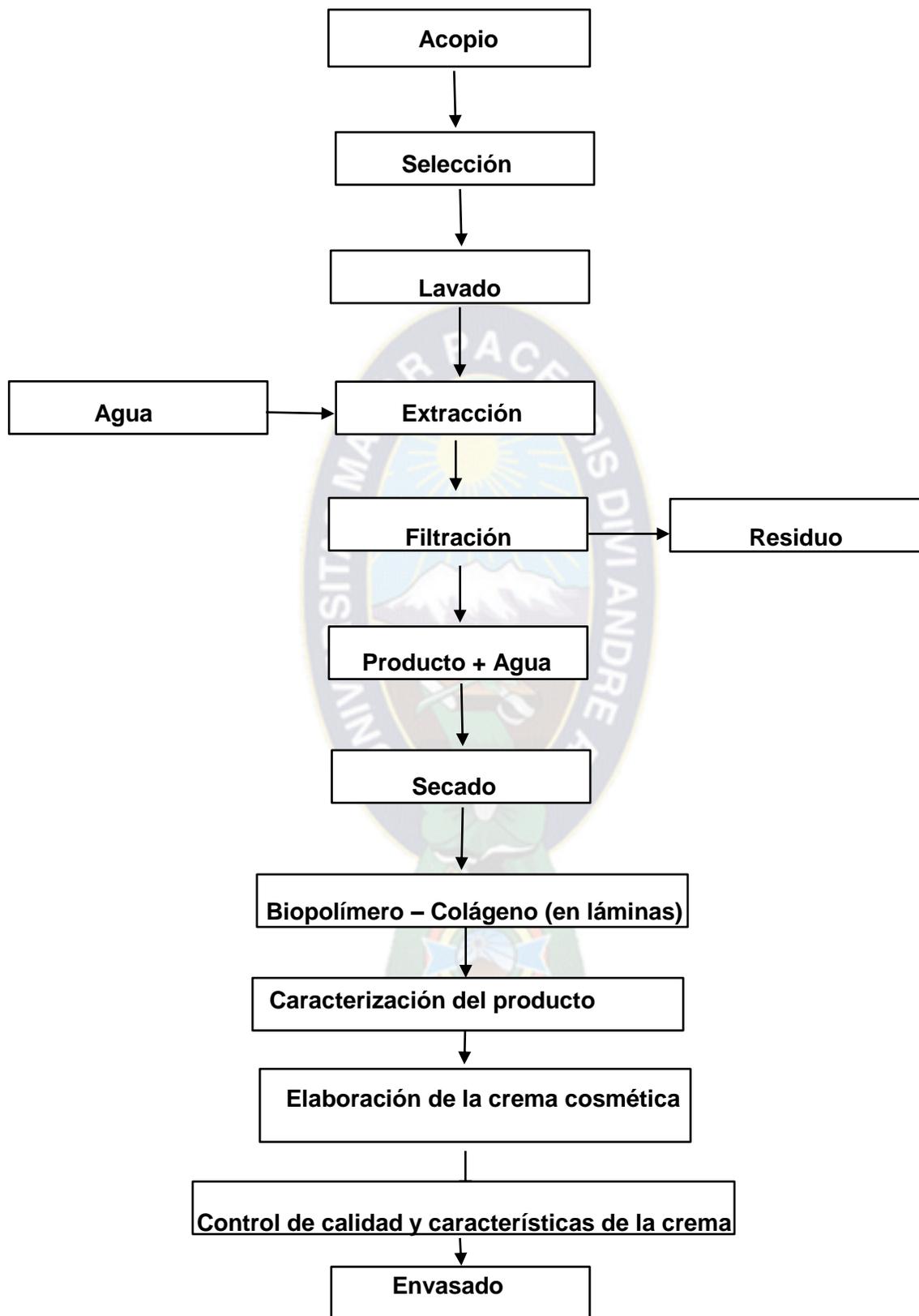


Figura 7: Diagrama de flujo. Elaboración propia

### 3.4. MUESTRA DE ANÁLISIS

La muestra utilizada para la realización de este proyecto son las escamas, aletas y colas de pescado “sábalo”.

### 3.5. RECOLECCIÓN Y TRATAMIENTO DE LA MATERIA PRIMA

La muestra fue recolectada de un puesto de venta de pescado en la ciudad de La Paz, el tratamiento que se realizó se describe a continuación.

#### 3.5.1. RECOLECCIÓN

Los desechos ya mencionados en el punto 3.4 que se observan en la **Fotografía 2** fueron recolectados del mercado Rodríguez ubicado en la Zona San Pedro de la ciudad de La Paz, durante el mes de agosto del año 2013. Estos puestos suelen tener como desechos las escamas colas y aletas, además de las vísceras, las cuales son depositadas como basura incrementando así la contaminación del medio ambiente.



**Fotografía 2:** Escamas de pescado recolectado en los puestos de venta.

#### 3.5.2. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Debido a que las escamas recolectadas se encuentran con alguna basura, manualmente se procede a retirarla, luego se lava con agua común para quitarles algún resto que podría haber quedado, para posteriormente obtener el colágeno mediante una metodología de tipo experimental.

En la **Fotografía 3** se muestran las escamas limpias y listas para poder extraer el colágeno.



**Fotografía 3:** Materia prima limpia.

### 3.6. EXTRACCIÓN DEL COLÁGENO

Se introduce las escamas en un recipiente cerrado, para realizar la extracción (sólido-líquido) se usa como único solvente agua y se lleva a temperatura de  $86^{\circ}\text{C}$  a una presión de 72 Kpa, por un intervalo de tiempo de dos horas, el tiempo depende de la cantidad de agua introducida y del peso de las escamas y aletas.

Este proceso se realizó varias veces para encontrar la cantidad de escamas, volumen de agua y tiempo más apropiado para la obtención de un gel compacto y con la menor cantidad de agua posible. En la **Fotografía 4** se observa el producto obtenido, después de que se realizó la extracción.



**Fotografía 4:** Producto extraído y residuo

### 3.6.1. FILTRACIÓN

En el proceso de filtración, se separa las escamas del líquido deseado, para esto se utilizó algodón y tela ya que el colágeno es una molécula de peso molecular muy grande y el líquido obtenido presenta una elevada densidad, para filtrarla se necesita un material que tenga poros más grandes, la filtración se la realiza rápidamente para evitar que se enfríe, no se pudo utilizar papel filtro debido a que el líquido es denso y en frío se va gelatinizando rápidamente impidiendo realizar la filtración razón por la cual se lo filtra en caliente.

### 3.6.2. PRODUCTO

El producto obtenido al enfriarse pasa de líquido a un estado de gel, al pesarlo se obtiene una masa de 35.8 g, es muy pegajoso y de color plomo, esto debido a que están presentes células cromatóforas, las células que proporcionan el color a la piel, por pruebas anteriores realizadas se observa que el color depende del tamaño de escamas que se utilice, si son de menor tamaño tiende a ser de un color plomo más intenso y si son más grandes el gel es de un color plomo claro, como se observa en la **Fotografía 5**.



(a)



(b)

**Fotografía 5:** (a) Escamas de mayor tamaño (b) Escamas de menor tamaño.

### 3.6.3. CONSERVACION DEL PRODUCTO PARA EVITAR SU DESCOMPOSICION

Para mantener conservado este gel se utilizó 0.2 g de metabisulfito de sodio y se llevó a refrigeración, se observó que no presenta formación de colonias de ningún tipo como se muestra en la **Fotografía 6**. Sin conservante y a temperatura ambiente solo tiene un tiempo de duración de 72 horas, pasado este tiempo empieza a descomponerse por acción microbiana como se observa en la **Fotografía 7**, refrigerándolo y sin necesidad de añadir conservantes, el producto se conserva solo 10 días, pasado este tiempo también empieza a descomponerse.



**Fotografía 6:** Biopolímero con estabilizante



**Fotografía 7:** Biopolímero sin estabilizante

Otra método para conservarlo sin necesidad de utilizar un estabilizante, es eliminando el agua en su totalidad, esto se realiza colocando el producto obtenido de la extracción en

un recipiente de plástico, formando una capa muy delgada, transcurrido el tiempo de secado se obtiene una lámina muy sólida y flexible como se muestra en la **Fotografía 8** totalmente libre de agua ya la presencia del agua en el biopolímero es la que causa su descomposición por la acción microbiana, el proceso de secado trascurrió en un lapso de tiempo de 15 días, a temperatura ambiente esto porque el biopolímero es muy sensible a temperaturas elevadas, el biopolímero extraído se mantuvo en un lugar fresco para la eliminación del agua.



**Fotografía 8:** Biopolímero seco.

### **3.7. IDENTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA**

El colágeno obtenido fue identificado y comparado con un patrón (colágeno hidrolizado 20) mediante el método de IR.

No se pudo realizar una comparación por el método de RMN debido a que el producto obtenido es un biopolímero que presenta varios elementos.

También mediante pruebas cualitativas como la Biuret y de la Ninhidrina se identificó la proteína.

#### **3.7.1. IDENTIFICACIÓN MEDIANTE EL MÉTODO DE IR**

Para este análisis se trituro la muestra utilizando 10 mg y luego se colocó en el equipo.

### 3.7.2. PRUEBAS CUALITATIVAS DE IDENTIFICACIÓN PARA EL COLAGENO

Para identificar el colágeno extraído de las escamas de pescado, se realizaron dos pruebas cualitativas, la de Biuret y la prueba de la Ninhidrina, siguiendo la marcha analítica que se describe en la **Figura 8**, los resultados de estas pruebas se basan en la obtención de un color, el mismo que nos indica que si el resultado es positivo o negativo.



**Figura 8:** Marcha analítica para la prueba de Biuret y de la Ninhidrina (24)

#### 3.7.2.1. PRUEBA DE BIURET

Para la identificación por el método de Biuret, se realizó el procedimiento que se describe en el anexo 1. Ver **ANEXO 1**. La intensidad del color violeta que se muestra en la **Fotografía 9** indica la existencia de enlaces peptídicos, para polipéptidos y proteínas.



**Fotografía 9:** Resultado con la prueba de Biuret

### 3.7.2.2. PRUEBA DE LA NINHIDRINA

Se realiza la prueba cualitativa de la Ninhidrina, para esto se siguieron los pasos que se describen en el anexo 2. Ver **ANEXO 2**. Si la prueba es positiva da un color violeta como se observa en la **Fotografía 10** polipéptido y aminoácidos.

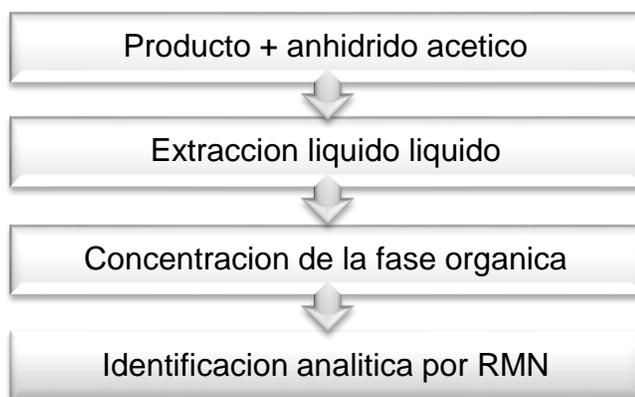


**Fotografía 10:** Resultado con la prueba de la Ninhidrina

### 3.8. ACETILACIÓN DEL COLAGENO

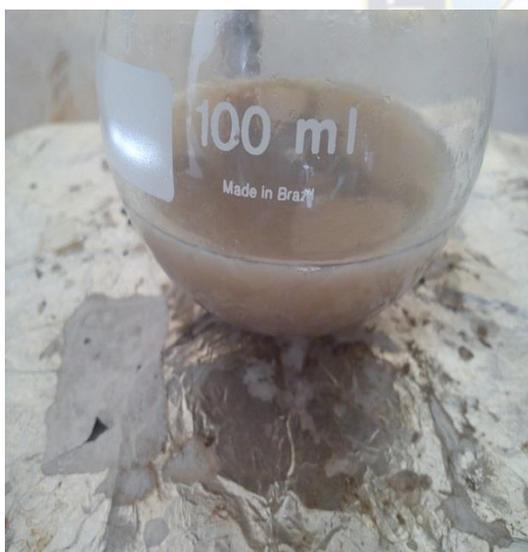
Se realiza una acetilación al biopolímero obtenido, posteriormente una extracción líquido-líquido, para separar el producto deseado que se encuentre en la fase orgánica, se siguieron los pasos que se describen en la **Figura 9**.

Obteniendo finalmente un derivado acetilado el mismo que se analizó mediante RMN para su identificación.



**Figura 9:** Proceso de obtención del derivado acetilado

Se pesó 20.3 g del biopolímero, el mismo que se encontraba en estado gelatinoso, se realiza la acetilación utilizando 15.0 ml de anhídrido acético y como catalizador 7 gotas de piridina, los tres componentes se colocaron en un balón como se muestra en la **Fotografía 11**, se dejó en reflujo con constante agitación magnética, a temperatura moderada durante 72 horas, en este tiempo se efectúa la reacción de acetilación.



Tiempo de reacción 24 hr



Tiempo de reacción 72 hr

**Fotografía 11:** Acetilación del colágeno.

Posteriormente se realiza una extracción líquido-líquido como se muestra en la **Fotografía 12**, para separar el producto de la mezcla, a través de un disolvente, y así poder obtener el componente deseado en forma pura o parcialmente pura, para su posterior determinación analítica.



**Fotografía 12:** Extracción líquido - líquido

Para la extracción líquido - líquido se utiliza acetato de etilo y agua, el pH es de 5, después de realizar la agitación al embudo de separación, se lo dejó en reposo durante 24 horas para obtener una mejor separación de la fase orgánica de la acuosa.

Debido a que el producto se encuentra en la fase orgánica, se separa la fase orgánica de la acuosa, posteriormente se realiza dos lavados con acetato de etilo para poder eliminar los ácidos presentes, finalmente concentrar a sequedad en un rotaevapor la fase orgánica, eliminando el solvente orgánico, obteniéndose un biopolímero de color ámbar.



**(a)**



**(b)**

**Fotografía 13: a), b) Derivado acetilado**

### **3.8.1. SOLUBILIDAD DEL DERIVADO ACETILADO**

Las pruebas realizadas fueron con diferentes solventes, usando una pequeña muestra de 4 mg del residuo acetilado y observando su disolución en 1 ml de solvente.

Solventes utilizados: Agua, éter, cloroformo, acetato de etilo.

### **3.8.2. IDENTIFICACIÓN DEL DERIVADO ACETILADO POR RMN**

El derivado acetilado, fue sometido al análisis espectroscópico de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN en un espectrómetro de RMN de 300 MHz, usando como solvente dimetilsulfoxido (DMSO).

### **3.9. PROCEDIMIENTO PARA LA ELABORACIÓN DE UNA CREMA COSMETICA**

Para determinar la potencial aplicación del producto obtenido “colágeno”, se elabora una crema dermatológica, a continuación se describe el procedimiento de ensayo a seguir, para su preparación. Finalmente se realizaron pruebas básicas de control de calidad a la crema obtenida, para cumplir con los requisitos establecidos en el Manual para Notificación Sanitaria Obligatoria de Cosméticos. (29)

#### **3.9.1. MATERIALES Y REACTIVOS**

##### **3.9.1.1. CRISTALERIA**

- Varilla
- Mortero
- Pipeta de 10 ml
- Vaso de precipitado de 100 ml
- Frasco de vidrio esterilizado

##### **3.9.1.2. REACTIVOS**

- Alcohol
- Crema base hidratante
- Agua de rosas

#### **3.9.2. TRATAMIENTO AL COLAGENO OBTENIDO EN EL PROYECTO**

La muestra se encuentra en estado sólido, presenta flexibilidad, está en forma de delgadas laminas, por eso es necesario triturar la muestra como se observa en la **Fotografía 13** antes de usarla para la elaboración de la crema.



**Fotografía 14:** Colágeno triturado.

### 3.9.2.1. ABLANDAMIENTO DEL PRODUCTO “COLÁGENO”

Debido al estado en el que se encuentra el colágeno es necesario ablandarlo para que se pueda mezclar con una crema base hidratante.

El colágeno es muy soluble en agua, razón por la cual se lo disolverá en agua de rosas a temperatura ambiente, ya que el colágeno puede desnaturalizarse si se utiliza temperaturas elevadas.

Se pesó 1.3 g de colágeno y se los disolvió en 15.0 ml de agua de rosas, manteniendo la mezcla en constante agitación, se observó que a los 20 minutos el colágeno se disolvió por completo en el agua de rosas, formando un solo producto.



**(a)**



**(b)**

**Fotografía 15:** a) Agua de rosas b) Colágeno diluido

### 3.9.3. ELABORACIÓN DE LA CREMA

Es la etapa final del proceso, en la que se mezcló la crema base hidratante con el colágeno disuelto en agua de rosas. Se utilizó 9 ml del producto obtenido en el punto **3.9.2.1** que se mezclaron con 30 g la crema base hidratante.



**Fotografía 16:** Crema cosmética facial

### 3.9.4. CARACTERIZACIÓN DE LA CREMA ELABORADA CON EL COLAGENO

Se realiza un análisis microbiológico de rutina según NB 32003, 32004, 32005, se utilizan estas normas debido a que el colágeno obtenido proviene del pescado que es de naturaleza comestible, se realizó además la identificación de la crema por medio de sus propiedades fisicoquímicas y organolépticas.

#### 3.9.4.1. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Se realiza un análisis microbiológico de rutina como se observa en la **Fotografía 15**, para determinar la presencia de mohos, levaduras, coliformes y mesófilos, la metodología que se realizó se encuentra descrita en el anexo 3. Ver **ANEXO 3**.



(a)

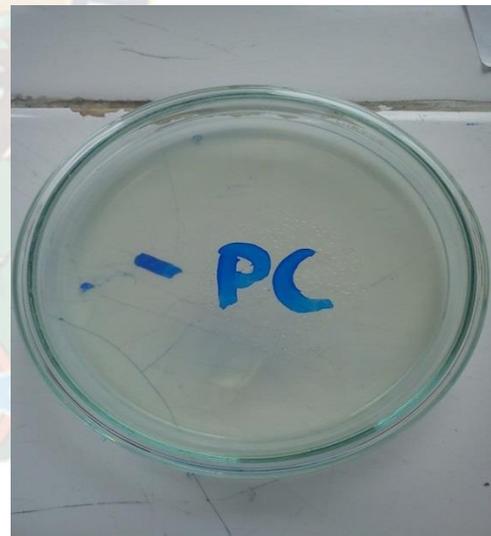


(b)

Fotografía 17: a), b) Dilución de la muestra



(a)



(b)

Fotografía 18: a), b) Resultados del recuento total de Mesófilos



**Fotografía 19:** Resultados de Levaduras y Mohos

**Fotografía 20:** Resultados de Coliformes

#### 3.9.4.2. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS Y SENSORIALES

Se determinan sus características organolépticas como: color, olor, textura.

Se mide el pH en el que se encuentra la crema, debido a que es de uso dermatológico y por esta razón el pH no puede ser ácido.

## CAPITULO IV

### 4. ANALISIS Y RESULTADOS

#### 4.1. EFECTO DEL TIEMPO DE EXTRACCIÓN SOBRE LA MAYOR CANTIDAD DE PÉRDIDA DE AGUA

Se realizaron distintas pruebas con respecto al tiempo de extracción, para la obtención del producto deseado. Los rendimientos se calculan de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Rendimiento} = \left( \frac{\text{Peso Final}}{\text{Peso Inicial}} \right) \times 100$$

##### Primera prueba:

$$m_{\text{(escamas inicial)}} = 100.1 \text{ g}$$

$$m_{\text{(biopolímero + agua)}} = 105.6 \text{ g}$$

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{105.6 \text{ g}}{100.1 \text{ g}} \times 100 = \mathbf{105.0 \%}$$

##### Segunda prueba:

$$m_{\text{(escamas inicial)}} = 100.1 \text{ g}$$

$$m_{\text{(biopolímero + agua)}} = 84.3 \text{ g}$$

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{84.3 \text{ g}}{100.1 \text{ g}} \times 100 = \mathbf{84.0 \%}$$

##### Tercera prueba

$$m_{\text{(escamas inicial)}} = 100.0 \text{ g}$$

$$m_{\text{(biopolímero + agua)}} = 50.3 \text{ g}$$

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{50.3 \text{ g}}{100.0 \text{ g}} \times 100 = \mathbf{50.0 \%}$$

##### Cuarta prueba:

$$m_{\text{(escamas inicial)}} = 100.8 \text{ g}$$

$$m_{\text{(biopolímero + agua)}} = 38.8 \text{ g}$$

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{38.8 \text{ g}}{100.8} \times 100 = \mathbf{38.0 \%}$$

### Quinta prueba:

$$m_{\text{(escamas inicial)}} = 100.0 \text{ g}$$

$$m_{\text{(biopolímero + agua)}} = 35.4 \text{ g}$$

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{35.4 \text{ g}}{100.0 \text{ g}} \times 100 = 35.0 \%$$

Se utilizó la misma masa de escamas e igual volumen de agua en las diferentes pruebas, variando el tiempo de extracción, primero se la realizo en 60 minutos, luego en 80 minutos, 120 minutos y 130 minutos. En la **Tabla 2** se muestran los diferentes tiempos utilizados y el rendimiento obtenido de cada uno.

Nº	m(escamas) g	V(H <sub>2</sub> O) ml	Tiempo (min)	R%	Observación
1	100,1	1000	60	105.0%	Tardo 12 horas en gelatinizarse
2	100.1	1000	80	84.0%	Tardo 8 horas en gelatinizarse
3	100.0	1000	90	50.0%	Tardo 6 horas en gelatinizarse
4	100.8	1000	120	38.0%	Tardo 3 horas en gelatinizarse, presenta una estructura muy sólida en seco
5	100,0	1000	130	35.0%	Tardo 3 horas en gelatinizarse, presenta una estructura muy sólida al perder toda el agua presente

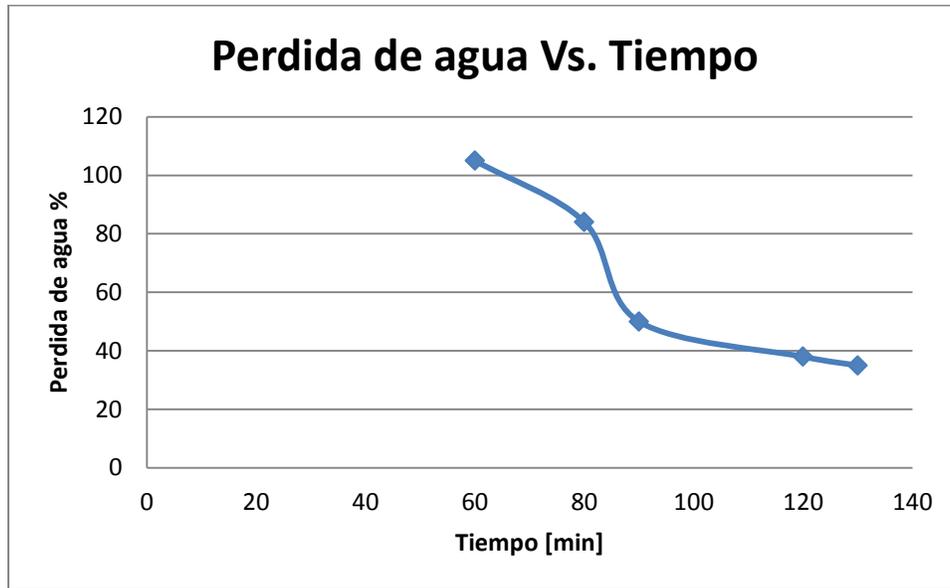
**Tabla 2:** Tiempos de extracción.

En las pruebas 1, 2 y 3 se observó que el tiempo que tardo en gelatinizar es más largo debido a que presenta mayor cantidad de agua y su estructura no es muy sólida, se observó que a los 3 días empieza a descomponerse y este producto ya no puede utilizarse. En las pruebas 4 y 5 el tiempo de extracción fue más largo para reducir la mayor cantidad de agua, como tiene menor cantidad de agua presenta una estructura

sólida y al realizar las láminas estas pierden toda el agua secándose por completo para ser posteriormente almacenadas.

En el **Grafico 1** se observa que si se realiza por un mayor tiempo la extracción, el producto pierde mayor cantidad de agua.

Para obtener una mejor conservación del producto es preciso eliminar la mayor cantidad de agua posible.



**Grafico 1:** Perdida de agua

En el siguiente grafico se observa que si se realiza por un mayor tiempo la extracción, el producto pierde mayor cantidad de agua.

Para obtener una mejor conservación del producto es preciso eliminar la mayor cantidad de agua posible.

En las pruebas 1 y 2 se observó que el tiempo que tardo en gelatinizar es más largo debido a que presenta mayor cantidad de agua, en las pruebas 3 y 4 se evaporó por más tiempo el agua, como presentan menor cantidad de agua su estructura es más sólida al realizar el proceso de secado.

#### **4.2. BALANCE DE MATERIA DEL PROCESO**

Los cálculos de balance se basan en los principios de conservación de la materia y de la energía y sirven para determinar los flujos. Debido a que la información de las corrientes

de entrada y corrientes deseadas de salida es indispensable para el diseño de cada pieza del equipo, resulta lógico afirmar que los cálculos de balance son de gran importancia en el diseño. (30) Se realizó un balance general del proceso, en el cual se utilizó para la obtención del colágeno una metodología experimental a nivel laboratorio.

Este balance general nos sirve para una aplicación futura de este proceso a un nivel de planta piloto. Para realizar el balance de materia del proceso, se tomó en cuenta los datos obtenidos en cada paso del proceso. Se partió de 100 g de materia prima y 1000 ml de agua que se utilizó como solvente, obteniendo finalmente el producto final con una masa de 21.3 g.

**DATOS Y CÁLCULOS:**

$F^1 = 105.3 \text{ g}$

$F^3 = 100.0 \text{ g}$

$F^4 = 500.0 \text{ g}$

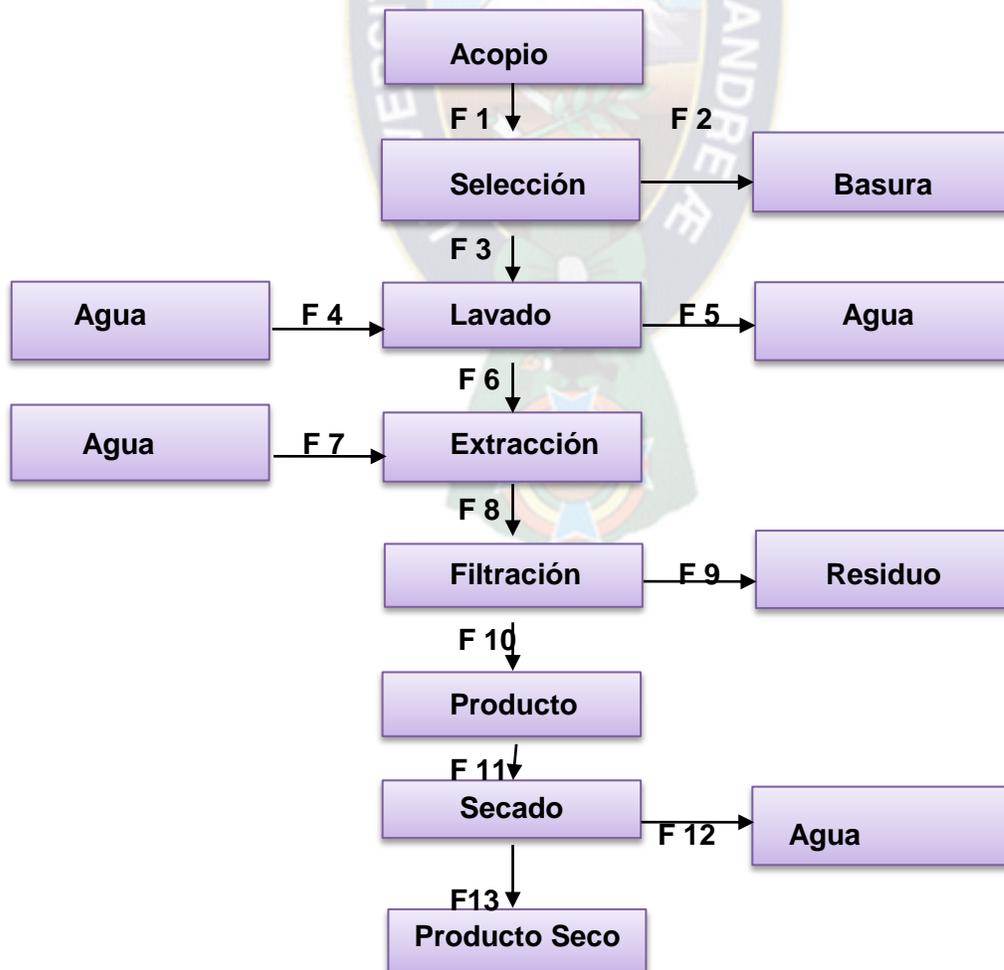
$F^7 = 1000.0 \text{ g}$

$F^{11} = 35.8 \text{ g}$

$F^{13} = 21.3 \text{ g}$

$F^6 = F^3$

$F^{10} = F^{11}$



SELECCIÓN:

$$F^1 = F^2 + F^3$$

$$105.3 = F^2 + 100 \rightarrow F^2 = 5.3$$

LAVADO:

$$F^3 + F^4 = F^5 + F^6$$

$$Si : F^3 = F^6 \rightarrow F^5 = 500.0$$

EXTRACCION:

$$F^6 + F^7 = F^8$$

$$100.0 + 1000.0 = F^8 \rightarrow F^8 = 1100.0$$

FILTRACION:

$$F^8 = F^9 + F^{10}$$

$$1100.0 = F^9 + 35.8 \rightarrow F^9 = 1064.2$$

SECADO:

$$F^{11} = F^{13} + F^{12}$$

$$35.8 = 21.3 + F^{12} \rightarrow F^{12} = 14.5$$

#### 4.2.1. ESCALA DE ANÁLISIS DEL PROCESO

Mediante esta propiedad se modifica la escala de análisis, planteando proyecciones del proceso a mayor escala a través de una simple regla de tres.

$$1Día (15 pescados) \rightarrow 568.1 g$$

$$30Días \rightarrow X$$

$$X = 17043.0 \frac{g (materia\ prima)}{mes}$$

En un mes se obtiene 17043 g/mes de residuos de pescados.

Partiendo de 100 g (peso húmedo) de materia prima, se obtuvieron 21.3 g de colágeno en peso seco.

$$100.0 g \rightarrow 21.3 g$$

$$17043.0 g \rightarrow X$$

$$X = 3630.2 \frac{g (colágeno)}{mes}$$

#### 4.2.2. CALCULO DEL RENDIMIENTO SEMI CUANTITATIVO

Se pesaron 100.0 g de escamas (peso húmedo) y se realizó la extracción con 1000 ml de agua (solvente), se obtuvo 35.6 g de producto (peso seco)

Datos:

$$m_{\text{(escamas)}} = 100.0 \text{ g}$$

$$m_{\text{(biopolímero extraído)}} = 35.6 \text{ g}$$

$$V_{\text{(H}_2\text{O)}} = 1000.0 \text{ g}$$

$$\% \text{ Rendimiento} = \left( \frac{35.6}{1000.0 + 100.0} \right) \times 100 = 3.2 \%$$

#### 4.3. CARACTERIZACION DE LA PROTEINA

##### 4.3.1. EVALUACIÓN SENSORIAL COMO UNA MEDICION DE CALIDAD AL PRODUCTO FINAL

Se realiza una análisis sensorial de la apariencia general del colágeno obtenido que se muestra en la **Tabla 3**, ya que este análisis sirve para medir la calidad del producto, se determinó también su solubilidad.

PROPIEDADES	PROTEINA
Dureza	Flexible
Olor	Neutral
Forma	Amorfo
Color	Ámbar claro
Solubilidad	Agua

**Tabla 3:** Análisis sensorial al Colágeno

#### 4.3.2. COMPARACIÓN DE LA MUESTRA CON UN PATRÓN, MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO

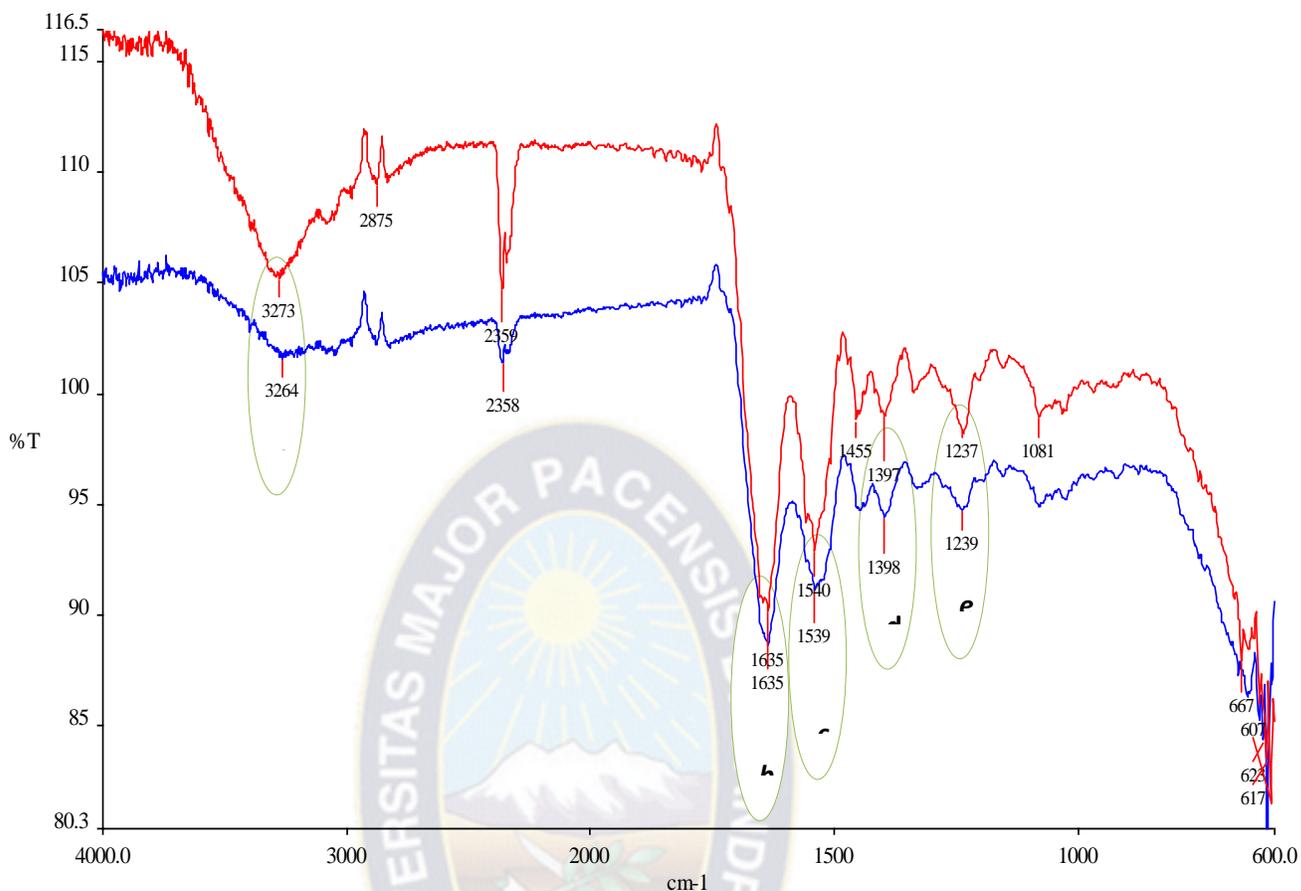
Se comparó mediante un análisis de Infrarrojo (IR) el colágeno obtenido, con una muestra patrón.

Los datos de las bandas detectadas experimentalmente en comparación con los datos detectados de la muestra patrón fueron los siguientes:

Número de banda	Datos Experimentales $cm^{-1}$	Datos de la Muestra Patrón $cm^{-1}$
a	3264	3273
b	1635	1635
c	1539	1540
d	1398	1397
e	1239	1237

Las bandas de absorción en  $2835\text{ cm}^{-1}$  y  $2359\text{ cm}^{-1}$  de la muestra patrón son de ruido así que no se las incluye para la comparación.

Los espectros obtenidos por medio del análisis de Infrarrojo se muestran en la **Figura 10**.



**Figura 10:** Espectro Infrarrojo de comparación

Muestra: Azul

Patrón: Rojo

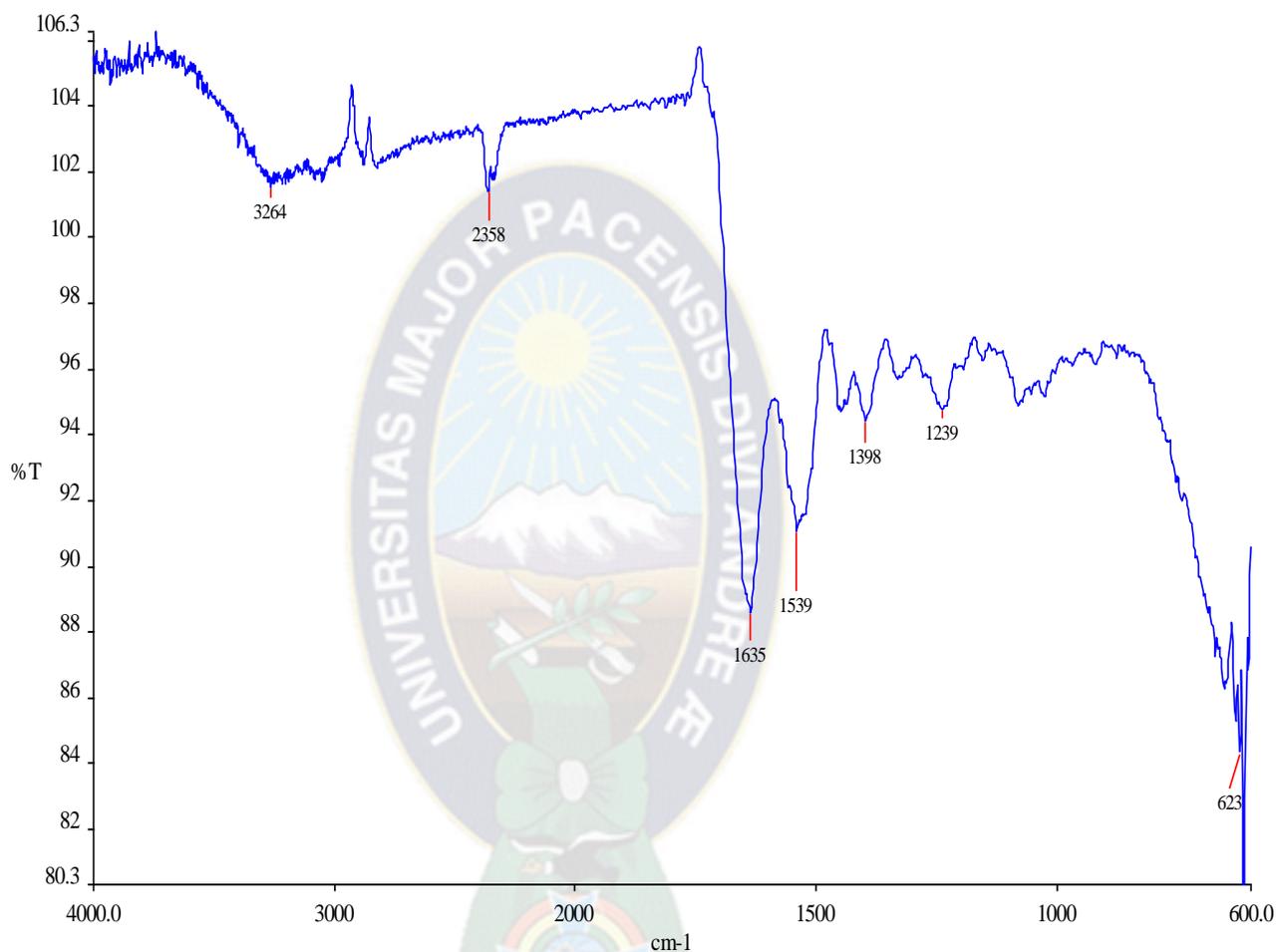
Los datos de las bandas detectadas en la muestra de colágeno obtenido experimentalmente, coinciden con los datos de la muestra patrón. Verificando que la muestra es colágeno.

La muestra patrón utilizada, es obtenida por medio de un proceso enzimático y es importado de una industria francesa por los Laboratorios Addax, fue adquirida de la Farmacia Sol en la ciudad de La Paz.

Se revisó en la ficha técnica la composición de los aminoácidos presentes en la muestra patrón, se observó que esta tiene un porcentaje óptimo de prolina, hidroxiprolina, y glicina, aminoácidos característicos del colágeno, los datos de su ficha técnica se encuentran en el anexo 4. Ver **ANEXO 4**

### 4.3.3. RESULTADOS DE INFRARROJO DE LA MUESTRA EXTRAIDA

El espectro Infrarrojo de la muestra de colágeno obtenida experimentalmente se muestra en la **Figura 11**.



**Figura 11:** Espectro de IR de la muestra extraída

El espectro presenta bandas de absorción en  $3264\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a una vibración de estiramiento  $N-H$ ,  $1635\text{ cm}^{-1}$  característico de una vibración de estiramiento del carbonilo  $C=O$ ,  $1539\text{ cm}^{-1}$  es una vibración de deformación  $N-H$  que corresponde a una amida secundaria,  $1398\text{ cm}^{-1}$  tenemos el estiramiento del anión carboxilato derivado de un ácido carboxílico  $COOH$ .

Estas bandas de absorción corresponden a el enlace peptídico o enlace amida característico de una proteína. (23)

#### 4.3.4. PRUEBAS CUALITATIVAS

A continuación se muestran los resultados obtenidos en las pruebas de identificación cualitativas. Para identificar la proteína se realiza la prueba de Biuret y la de la Ninhidrina, en la primera de acuerdo a la intensidad del color se verifica la presencia de enlaces pépticos propios de una proteína “colágeno”, en la segunda se verifica la presencia de aminoácidos los cuales componen una proteína, las dos pruebas realizadas confirmaron la presencia tanto de enlaces pépticos como de  $\alpha$ -aminoácidos.

	<b>BIURET</b>	<b>NINHIDRINA</b>
<b>RESULTADO</b>	Positivo (+) Presencia de enlaces peptídicos	Positivo (+) Presencia de $\alpha$ -aminoácidos
<b>OBSERVACIONES</b>	Formación de un Color violeta	Formación de un Color violeta intenso

Tabla 4: Resultados de las pruebas cualitativas

#### 4.4. RESULTADOS DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR, $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ , DEL DERIVADO ACETILADO

Se obtuvieron los espectros de RMN- $^{13}\text{C}$  y RMN- $^1\text{H}$  para el derivado del acetilado que se muestran en las **Figuras 13 y 15**. Se realizó el análisis de RMN- $^1\text{H}$  y RMN- $^{13}\text{C}$  mediante comparación utilizando el programa ChemDraw y se determinó que los mismos corresponden al imidazol -5ol acetato, tomando en cuenta en ambos casos que se hizo una acetilación y que el grupo acetilo se introdujo en el compuesto químico.

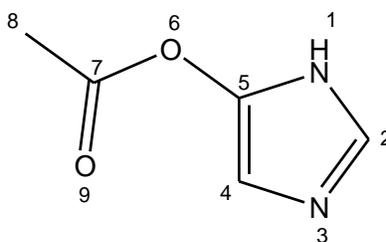


Figura 12: Estructura del Imidazol - 5 ol acetato

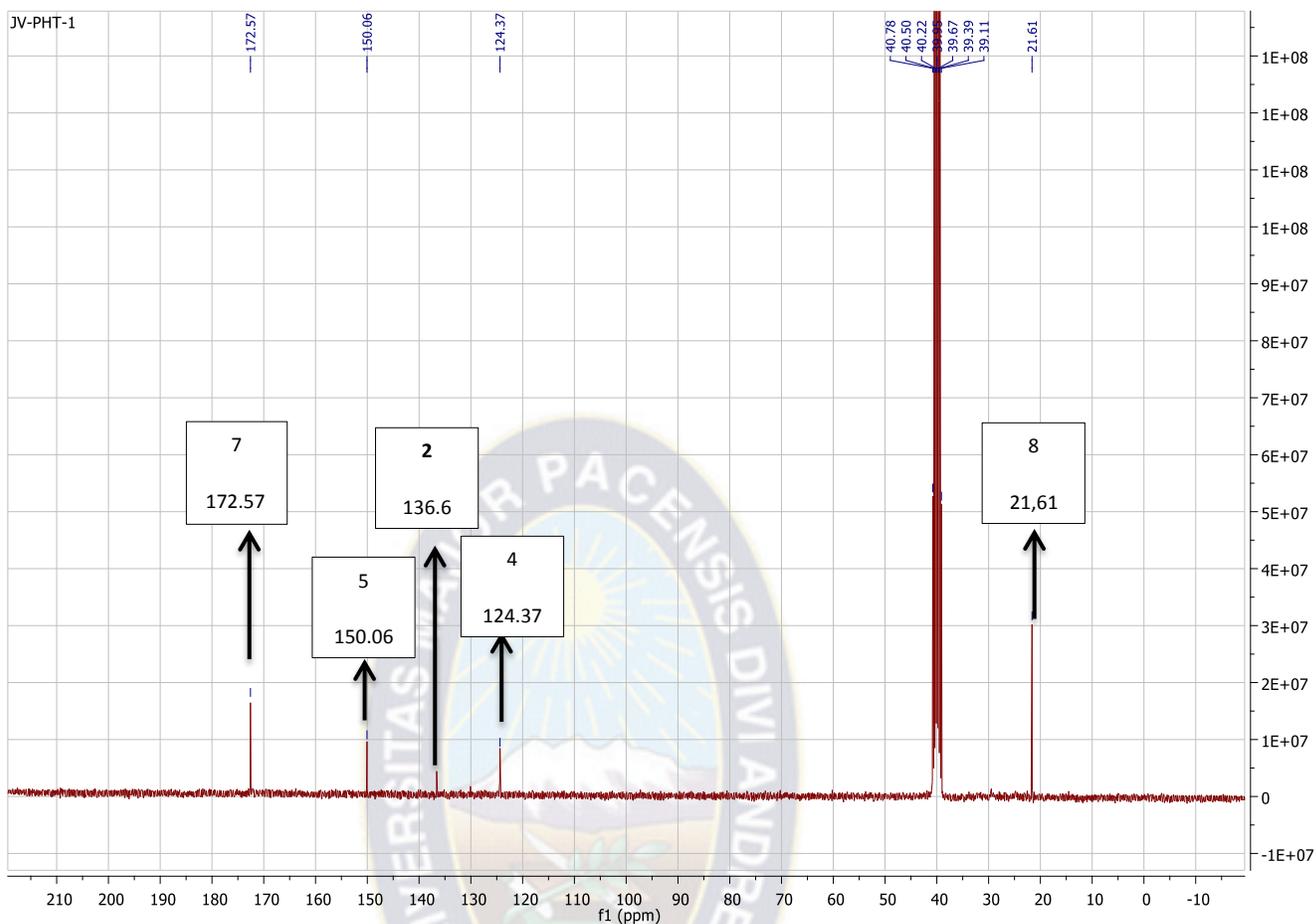


Figura 13: Espectro RMN- $^{13}\text{C}$

En la **Figura 14** se observa en el espectro para el RMN- $^{13}\text{C}$  que se pudo predecir con el ChemDraw el cual es muy parecido al que se obtuvo experimentalmente.

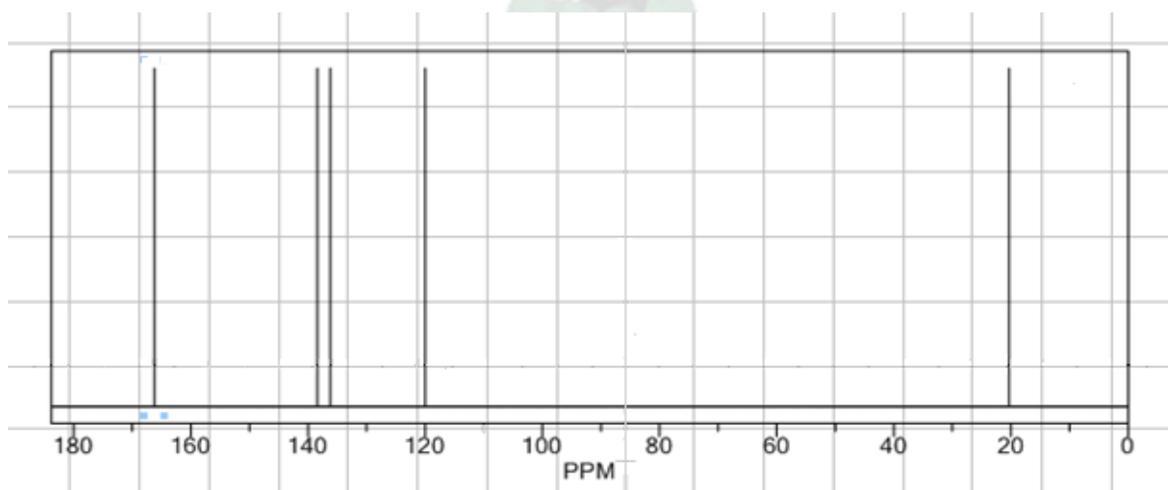
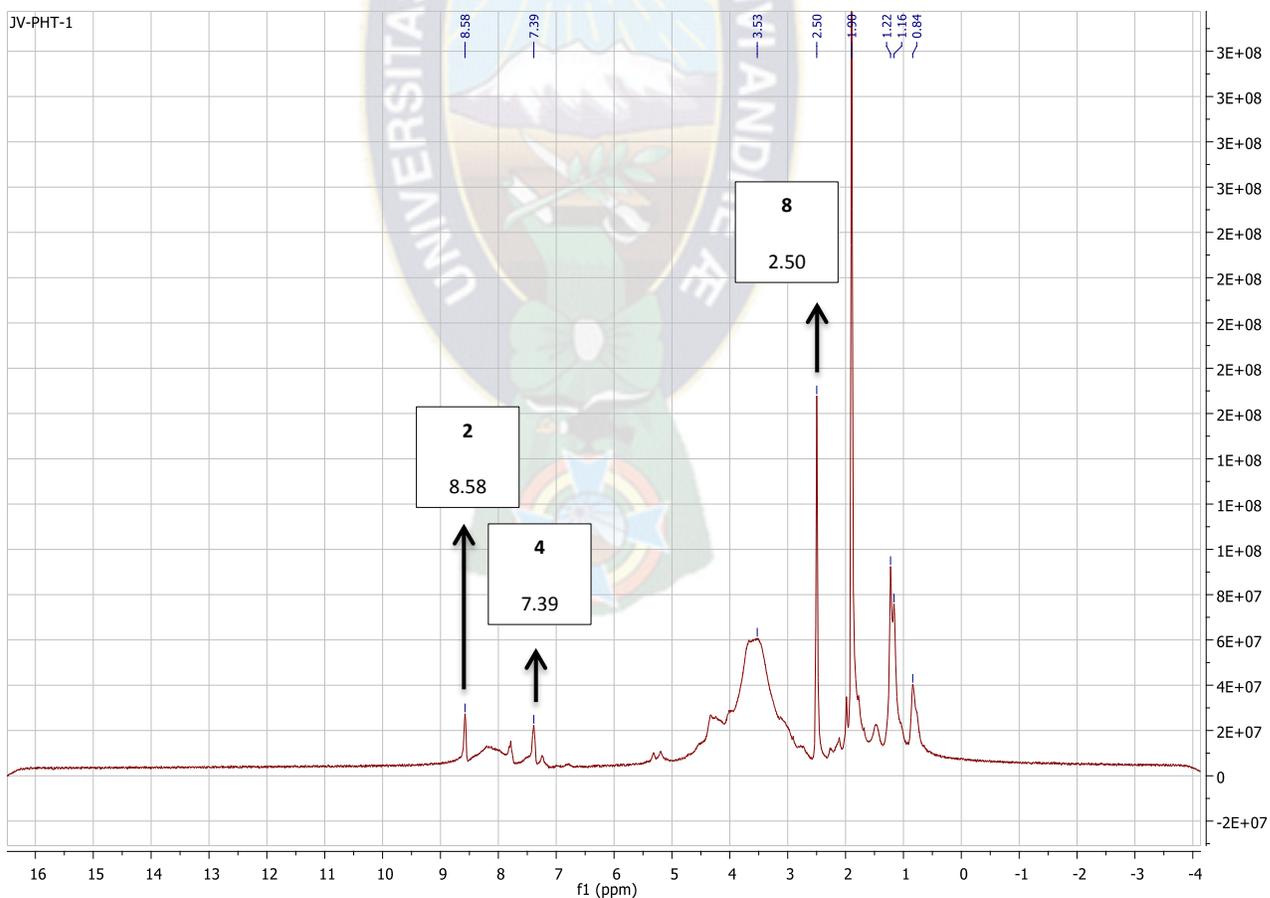


Figura 14: ChemNMR C-13 Estimación

Comparación de desplazamientos químicos RMN-<sup>13</sup>C

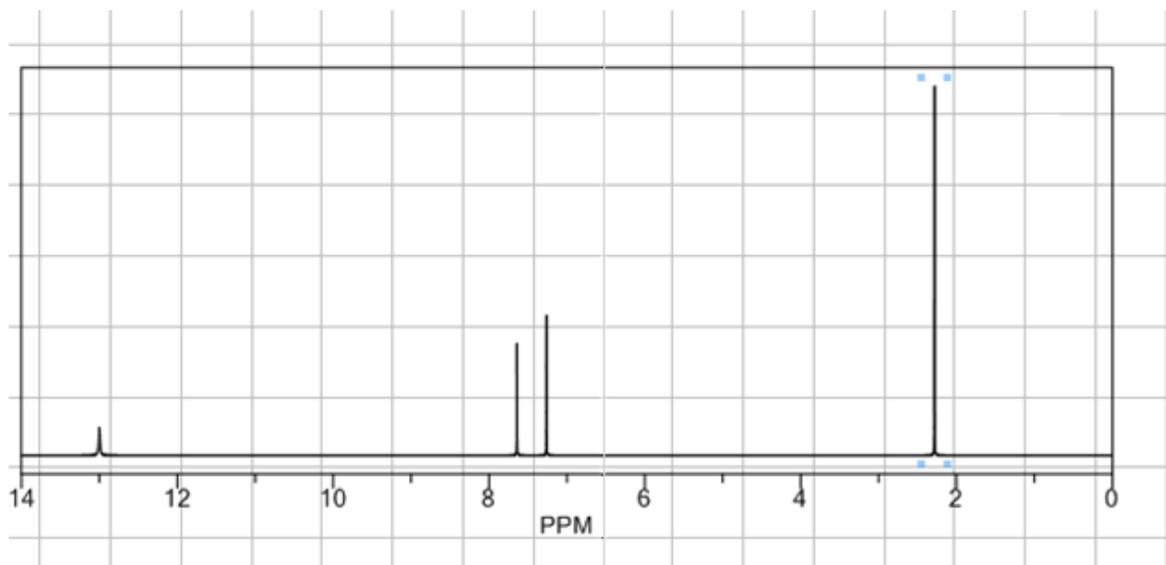
N° de átomo	Asignación	ChemRMN- <sup>13</sup> C δ(ppm)	Datos experimentales δ(ppm)
2	CH	136.2	136.6
4	CH	120.0	124.3
5	C	138.4	150.6
7	C	166.2	172.5
8	CH <sub>3</sub>	20.3	21.6

En la **Figura 15** se observa el espectro de RMN-<sup>1</sup>H.



**Figura 15:** Espectro RMN-<sup>1</sup>H

El espectro de RMN-<sup>1</sup>H corresponde al imidazol-5ol acetato Sin embargo el espectro también muestra señales entre  $\delta$  3,0 y 3,5 donde se observa la presencia de protones CH que corresponderían a la presencia de carbohidratos, el cual se encuentra en menor proporción con respecto al producto principal. En la **Figura 16** se muestra el espectro obtenido con el programa.

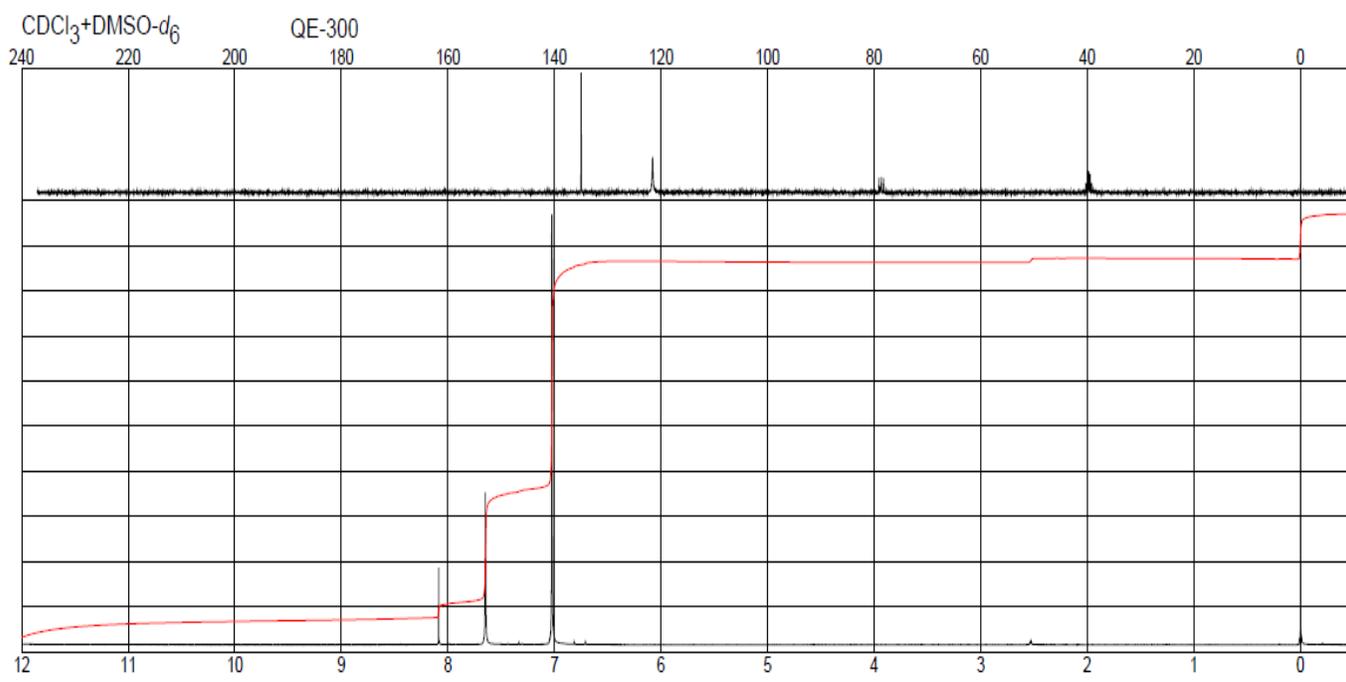


**Figura 16:** ChemNMR H-1 Estimación

Comparación de desplazamientos químicos RMN-<sup>1</sup>H

N° de átomo	Asignación	ChemRMN- <sup>1</sup> H $\delta$ (ppm)	Datos experimentales $\delta$ (ppm)
2	CH	7.64	8.58
4	CH	7.26	7.39
8	CH <sub>3</sub>	2.28	2.50

En la **Figura 17** se observa un espectro teórico del imidazol, en el cual muestra que para RMN-<sup>13</sup>C se tiene señales entre  $\delta$  120 y 140, para el RMN-<sup>1</sup>H se observan las señales entre  $\delta$  7 y 8.5, en ambos casos las señales coinciden con las de los espectros obtenidos experimentalmente.



**Figura 17:** Espectro teórico del imidazol

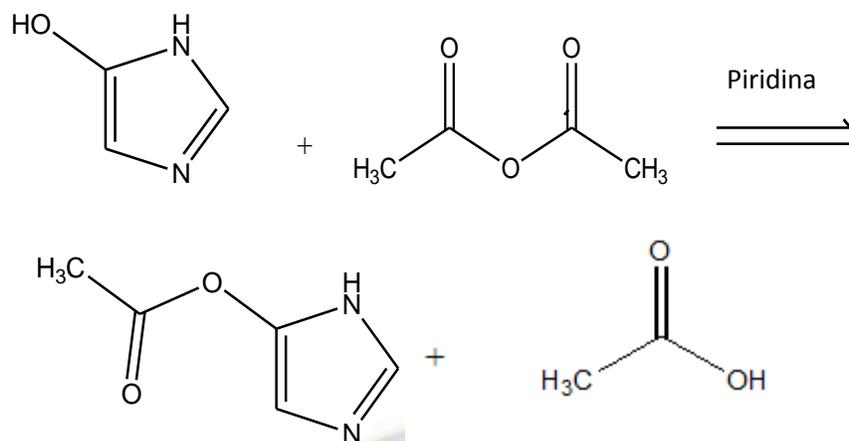
*Propiedades:* el imidazol (glioxalina) es una sustancia que se disuelve fácilmente en agua y etanol, de p.f. 90°C (363°K). La considerable mayor basicidad del imidazol se debe posiblemente a su estructura cíclica de amidina. Las sustituciones electrófilas se producen preferentemente en las posiciones 4 ó 5.

*Derivado más importantes:* del imidazol se deriva el aminoácido histidina. (31)

La histidina es un aminoácido esencial presente en el colágeno, este fue obtenido como era de esperarse ya que en un estudio que se realizó en el Departamento de Química en la Universidad de Malaya, se hizo una acetilación del colágeno en cual se determinó que la arginina e histidina en mezclas de anhídrido acético y piridina reaccionan como el único grupo  $\alpha$ -amino. (21)

#### 4.4.1. REACCIÓN DE ACETILACIÓN

El producto mayoritario identificado en el análisis de RMN fue el imidazol-5ol. En esta reacción se introdujo el grupo acetilo al compuesto sustituyendo a un átomo de hidrogeno del oxidrilo, generando un éster específico.



#### 4.4.2. RENDIMIENTO SEMI CUANTITATIVO DEL COMPUESTO DERIVADO DE LA ACETILACION

Para poder determinar una estructura química del producto se realiza una acetilación, se pesó 20.3 g del gel extraído y se obtuvo 1.6 g de residuo acetilado

➤ Datos:

$$m_{\text{(gel extraído)}} = 20.3 \text{ g}$$

$$m_{\text{(residuo acetilado)}} = 1.6 \text{ g}$$

Rendimiento experimental:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{1.6}{20.3} \times 100 = 7.9 \%$$

#### 4.4.3. SOLUBILIDAD

El residuo acetilado fue sometido a diferentes solventes, para determinar su solubilidad.

SOLVENTE	RESULTADO
Éter	Negativo
Cloroformo	Negativo
Agua	Positivo
Acetato de etilo	Negativo

#### 4.5. ANÁLISIS DE CALIDAD DE LA CREMA COSMETOLÓGICA

Un producto cosmético que cumpla con alguna de las condiciones establecidas del Cuadro II del **Anexo 5**, se presumirá que está libre de contaminación microbiológica. La crema elaborada debe cumplir con los requisitos microbiológicos y fisicoquímicos, establecidos, los resultados del análisis realizado a la crema se compararan con los parámetros descritos de la Resolución 1418 de la Comunidad Andina. <sup>(32)</sup>

Debido a que se realizaron pruebas básicas de control de calidad a la crema y como la misma no tiene ningún estabilizante, recomendamos que pueda ser utilizada máximo en el lapso de un mes ya que pasado ese tiempo se descompone.

##### 4.5.1. RESULTADOS DEL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LA CREMA

La crema elaborada cumple con los límites microbiológicos aceptados y establecidos de la Comunidad Andina como se observa en la **Tabla 5**.

MÉTODO DE ANÁLISIS	PARÁMETRO	RESULTADO	LIMITE ACEPTADO
NB 32003	Recuento total de Mesófilos	1x10 <sup>3</sup> UFC	1 x 10 <sup>3</sup> UFC/g o ml
NB 32004	Levaduras	0 UFC/g	—
NB 32004	Mohos	0 UFC/g	—
NB 32005	Recuento total de Coliformes	0 UFC/g	0 UFC/g

**Tabla 5:** Análisis Microbiológico de la crema cosmetológica

#### 4.5.2. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS Y ORGANOLEPTICAS

Se realiza un análisis fisicoquímico y organoléptico a la crema para poder determinar características importantes como el pH, color ya que proviene de escamas de pescado es necesario saber si el producto final presenta algún olor.

CARACTERISTICAS	
Color	Rosado claro
Olor	Inoloro
Textura	Amorfa
Estado	Cremoso
pH	Neutro



## CAPITULO V

### CONCLUSIONES

- La metodología experimental que se aplicó, fue efectiva para la extracción del colágeno de las escamas de pescado, ya que se obtuvo un biopolímero de aspecto sólido y sin tendencia a la descomposición por acción microbiana, es una metodología factible ya que aparte de otorgar un grado de importancia a estos residuos, ayuda a disminuir la contaminación ambiental y a liberarnos de los óxidos de trimetilamina producidos en la descomposición bacteriana de dichos desechos (escamas, colas y aletas).
- El solvente óptimo para la extracción siguiendo los objetivos planteados es el agua, debido a que tiene la característica de ser una molécula polar y reacciona con aquellos compuestos que igualmente son polares, también porque es el único compuesto químico que se halla en la naturaleza en grandes cantidades, es un solvente universal y económico.
- El rendimiento del colágeno obtenido fue de 3.2 % partiendo de 100.0 g de materia prima, siendo el factor principal el tiempo de extracción, pues se debe realizar en un tiempo óptimo de 130 minutos, para 100.0 g de materia prima, si el tiempo de extracción es muy corto, al secarlo no se podrá eliminar el agua en su totalidad en el lapso de tiempo esperado, y el producto se deteriorara fácilmente, si se excede con el tiempo de extracción el colágeno se desnaturaliza.
- La identificación de colágeno se la realizó por comparación de IR con una muestra patrón, los datos de la muestra patrón son iguales a los del colágeno obtenido en el presente proyecto. Además en el espectro (Figura 11) se identificó al **Enlace Amida** que confirmó que es colágeno.
- Las pruebas cualitativas de Biuret y de la Ninhidrina reaccionaron con la proteína como se esperaba.
- Se determinó la estructura molecular del derivado acetilado, con un análisis de RMN con lo que se confirmó que la estructura es perteneciente al imidazol-5ol. Del imidazol deriva el aminoácido histidina.
- Al realizar las diferentes pruebas de análisis de espectroscopia de IR y RMN, además de las pruebas cualitativas, se confirma que el biopolímero obtenido por medios que involucran la química verde es colágeno.

- Se realizó la preparación de una crema dermatológica con el propósito de validar la potencial aplicación de este biopolímero. Con los resultados de las pruebas microbiológicas se concluye que la crema cumple con las condiciones establecidas en la Resolución 1418 de la Comunidad Andina.
- Con todos los resultados de la obtención del colágeno, tanto como de la identificación y también de la aplicación del colágeno en una crema, se confirma que se cumplió con todos los objetivos planteados.



## CAPITULO VI

### RECOMENDACIONES

- Se recomienda promover el uso de desechos de pescado, el cual es muy común en los mercados de la ciudad de La Paz, para poder darle un grado de importancia a este residuo, obteniendo colágeno, el cual no solo tiene fines cosmetológicos, sino también puede ser utilizado como un suplemento nutricional muy sano para la alimentación.
- Realizar una optimización del proceso de extracción de colágeno, para poder proyectarlo a nivel planta piloto.
- Se recomienda optimizar el proceso de filtración para no tener pérdidas del producto extraído.
- Utilizar la materia prima recolectada en un lapso de tiempo no mayor a las 24 horas, para evitar su descomposición.
- Realizar un estudio del perfil proteico de la molécula a través de una electroforesis.
- Realizar un estudio de la composición de los principales aminoácidos presentes en el colágeno extraído de las escamas de pescado.
- Realizar pruebas de análisis clínico a la crema dermatológica para posteriormente poder lanzarla al mercado.

## CAPITULO VII

### 7. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- RAMON AHUMADA Y ANNY RUDOLPH, “*Ambiente y Desarrollo*,” Residuos líquidos de la Industria Pesquera: Alteraciones Ambientales y Estrategias de Eliminación. Volumen V, Año 1989, pág. 151
- 2.- NELFA FRANCISCA MAMANI CONDORI, “Producción de Colágeno a partir de Huesos de Llama (*Lama glama*)”. Tesis de Grado UNIVERSIDAD TÉCNICA DE ORURO FACULTAD NACIONAL DE INGENIERÍA INGENIERÍA QUÍMICA, Año 2007.
- 3.- MAMANI CHAMBI SARA FABIOLA, “Obtención del colágeno en la curtiembre Macubol Ltda”. Tesis de grado UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES – FACULTAD DE INGENIERIA – CARRERA DE INGENIERIA INDUSTRIAL, Año 2008
- 4.- ESPINOZA MURGA, REINA MARTHA, “Recuperación del colágeno en la empresa SAMI S.R.L.”. Universidad Mayor De San Andrés – Facultad DE Ingeniería – CARRERA DE INGENIERIA QUIMICA, Año 2006.
- 5.- ING. JENIFER CAROLINA SERRANO GAONA, “Estandarización de un proceso de extracción de colágeno a partir de los residuos de fileteo de tilapia (*Oreochromis*) y cachama (*Piaractusbrachypomus*)”, tesis para Magister en Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ingeniería, Año 2011, Pág. 6-8.
- 6.- TAKESHI NAGAI,<sup>1\*</sup> MASAMI IZUMI<sup>2</sup> & MASAHIDE ISHII “Fish scale collagen. Preparation and partial characterization” International Journal of Food Science and Technology, Japón, Año 2004.
- 7.- FENGXIANG ZHANG, ANNING WANG, ZHIHUA LI, SHENGWEN HE, LIJUN SHAO “Preparation and Characterisation of Collagen from Freshwater Fish Scales” Food and Nutrition Sciences, Año 2011.
- 8.- SANKAR S,S SEKAR, MOHAN R, RANI S, SUNDARASEELAN J, SASTRY TP. “Preparación y caracterización parcial de la lámina de colágeno de pescado (Lates calcarifer) escamas”.
- 9.- W. TORRES ARREOLA, R. PACHECO AGUILAR, R .R. SOTELO MUNDO, O. ROUZAUD SÁNDEZ, J. M. EZQUERRA BRAUER, Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal, vol. 6, núm. 2, Año 2008, México, Pág. 101.

- 10.-** W. A. MILLANO y J. MORALES, Revista Técnica de Ingeniería – Universidad de Zulia, vol. 12 Año 1989, Venezuela, Pág. 65.
- 11.-** LOS TIEMPOS-LEDEZMA, SÁBALO, amenazado por la contaminación, miércoles 16 de octubre del 2013.
- 12.-** PATRICIA ERGUETA S Y CECILE DE MORALES(EDS), Libro Rojo de los Vertebrados de Bolivia, Editorial Offsel Boliviana EDOBOL, Año 1996, Bolivia La Paz, Pág. 37
- 13.-** FENGXIANG ZHANG- ANNING WANG- ZHIHUA LI1-SHENGWEN HE-LIJUN SHAO, Preparation and Characterisation of Collagen from Freshwater Fish Scales, *Food and Nutrition Sciences*, Año 2011, University, Weifang, China, Pág 118
- 14.-** NERLIS PAOLA PÁJARO CASTRO, JESÚS TADEO OLIVERO VERBEL, “Química verde: un nuevo reto”, Ciencia e Ingeniería Neogranadina, vol. 21, núm. 2, Año 2011, Pág. 169,172.
- 15.-** TERESA DE DIEGO PUENTE, “La química verde un reto para el futuro”, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular B e Inmunología, Año 2012, Pág. 8
- 16.-** <http://petroquimicosuni.blogspot.com/>
- 17.-** <http://www.google.com.bo/imgres?imgurl=http%3A%2F%2Fbioquimica7.wikispaces.com%2Ffile%2Fview%2Famino%2525C3%2525A1cidos.gif%2F283372432%2F560x560%2Famino%2525C3%2525A1cidos>.
- 18.-** MORRISON - BOYD, Química Orgánica, Quinta Edición, Año 1998, México, Pág. 1323-1325, 1342,1343.
- 19.-** ROBERT K, MURRAY, PETER A. MAYES, DARYL K. GRANNER, VICTOR W.RODWELL Harper Bioquímica Ilustrada, Editorial El Manual Moderno, Año 1990, México DF- Bogotá, D.C. Pag.39, 40, 43, 597, 598, 599.
- 20.-** ING. JENIFER CAROLINA SERRANO GAONA, “Estandarización de un proceso de extracción de colágeno a partir de los residuos de fileteo de tilapia (*Oreochromis*) y cachama (*Piaractusbrachypomus*)”, tesis para Magister en Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ingeniería, Año 2011, Pág. 6-8.
- 21.-** BY R. W. GREEN - K. P. ANG - L. C. LAM, Chemistry Department, University of Malaya, Año 1952, Singapore, “Acetylation of Collagen”, Vol. 54, Pág. 181-186

- 22.-** CHRISTIAN DAVID CASTRO VARGAS, Obtención de colágeno de crestas de pollo, Universidad Industrial de Santander Facultad de Ciencias Básicas, Escuela de Químicas Bucaramanga, Año 2011, Pág. 18, 23.
- 23.-** JOSE LUIS ARIAS MOSCOSO, "Estudio de biopelículas de compositos de colágeno de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) y quitosina", Thesis of Dissertation Master of Science, Universidad de Sonora División de Ciencias Biológicas y de la salud Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos Programa de Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos, Año 2009, Pág. 19-20.
- 24.-** UNIVERSIDAD NACIONAL EXPERIMENTAL RÓMULO GALLEGOS, Área de ingeniería agronómica dirección de estudios comunes departamento de asignaturas instrumentales cátedra de Bioquímica. Practica 1 Identificación de Aminoácidos y Proteínas.
- 25.-** ROBERT M. SILVERSTEIN, G. CLAYTON BASSLER, TERENCE C. MORILL. Identificación Espectrometría de Compuestos Orgánicos – Editorial Diana - Año 1994.- México. Pág. 171 y 211
- 26.-** CLIFORD J. CRESWELL. OLAF RANQUIST MALCOM M. CAMBEL. Análisis espectral de compuestos orgánicos, Editorial Diana, Primera edición, Año 1979, México Pág. 22.
- 27.-** <http://www.colagenoencapsulas.com/tag/cremas-colageno/>
- 28.-** <http://spanish.alibaba.com/p-detail/100%25-Pure-Ha-%26-Q10-Col%C3%A1geno-Cristalino-M%C3%A1scara-Facial-300000578237.html>
- 29.-** ESTADO PLURINACIONAL DE BOLIVIA MINISTERIO DE SALUD Y DEPORTES- UNIMED "Unidad de medicamentos y tecnología en salud", MANUAL PARA NOTIFICACIÓN SANITARIA OBLIGATORIA DE COSMÉTICOS, Año 29 de enero del 2003, Tomo 23, Pág. 4.
- 30.-** G.V. REKLAITIS, Balance de Materia y Energía, Tercera Edición, Año 1990, México, Pág. 7.
- 31.-** HANS BEYER - WOLFGANG WALTER, Manual de Química Orgánica, Edición Española, Pág. 798-800
- 32.-** COMUNIDAD ANDINA - SECRETARIA GENERAL, Límites del contenido Microbiológico de Productos Cosméticos, Resolución 1418, 9 de junio del 2011.

## ANEXOS

### ANEXO 1

#### PRUEBA DE BIURET

En un tubo limpio se colocó 1ml de la muestra, luego se agregó 1ml de solución de Na(OH) al 10% y se mezcló para posteriormente ir añadiendo gota a gota la solución de  $\text{CuSO}_4$  al 0.5% agitando después de cada adición hasta la aparición de un color violeta.

### ANEXO 2

#### PRUEBA DE LA NINHIDRINA

En un tubo limpio se colocó 1ml de la misma muestra y se adiciono 1ml de la solución de Ninhidrina al 0.1%. Esta solución se debe mezclar bien y llevar a baño maría durante dos minutos.

### ANEXO 3

#### MICROBIOLOGÍA: METODOLOGÍAS PARA EL ANALISIS DE COLIFORMES, MESOFILOS, MOHOS Y LEVADURAS.

#### MATERIALES

- Pipetas de 1 ml
- Pipetas de 5 ml
- Pipeta de 10 ml
- Matraces de 500 ml
- Cajas Petri
- Tubos de ensayo con tapa rosca
- Gradilla
- Bureta de 500 ml
- Bureta de 100 ml
- Balón de 100 ml
- Autoclave

- Espátula
- Asa de incubación
- Algodón
- Papel madera
- Gasa
- Mechero
- Tijera

### **Reactivos**

- Agua destilada
- Alcohol
- Plate Count Agar PCA
- Papa Dextrosa Agar PDA
- Maconckey
- Peptona

### **PROCEDIMIENTOS:**

#### **PREPARACION DEL MEDIO PARA LA MUESTRA “AGUA PEPONADA”.**

Preparar peptona al 1%, pesar, diluir en agua, posteriormente colocar 9 ml de agua peptonada en los tubos de ensayo y 225 ml en un matraz de 500 cc, realizar todo en condiciones estériles para evitar la contaminación luego llevar a la autoclave.

#### **PREPARACION DEL MEDIO “PCA” NB 32003**

Disolver el medio pesado en agua destilada, ajustar el pH de manera que después de la esterilización sea de 7.0 a 45 °C. Trasvasar el medio de cultivo matraces de capacidad no mayor a 500ml y no más de la mitad del volumen del recipiente. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

#### **PREPARACION DEL MEDIO “PDA” NB 32006**

Disolver el medio pesado en agua destilada, completar el volumen a 1000 ml. Calentar hasta a ebullición hasta la disolución total del medio, ajustar el pH a 6,6, esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Para ajustar el pH aproximadamente 7 al medio de cultivo, a la temperatura de 45 °C a 50 °C.

## PREPARACION DEL MEDIO "MACONKEY"

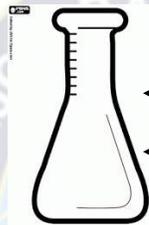
Disolver el medio pesado en agua destilada, ajustar el pH de manera que después de la esterilización sea de 7.0 a 45°C. Trasvasar el medio de cultivo matraces de capacidad no mayor a 500 ml y no más de la mitad del volumen del recipiente. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

### PROCEDIMIENTO:

1.- Alimento homogenizado

1:10

1 ml



← 225 ml de diluyente

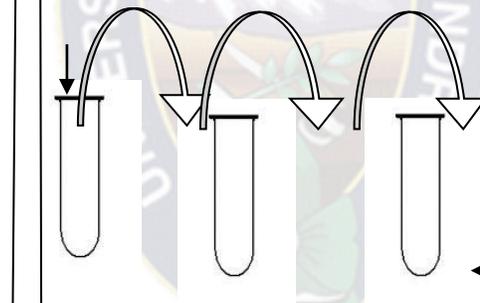
← 25g o ml del alimento

2.- Dilución

1ml

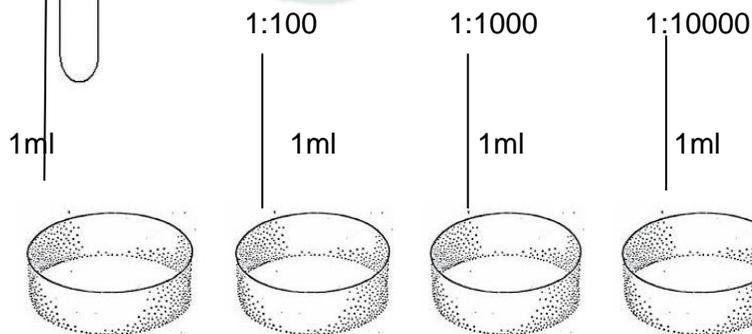
1ml

1ml



9 ml de diluyente

3.- Se vierte con una pipeta 1ml de cada tubo en una placa esterilizada



4.- Se vierten 20ml del medio de agar para el cómputo en placas

5.- Incubación para el medio PDA: entre 22 °C a 25 °C durante 72 hr para el recuento de levaduras y 120 hr para el recuento de mohos.

Incubación para el medio PCA: a temperatura de 35 °C durante 48 hr para el recuento total de bacterias mesófitas aerobias.

Incubación para el medio mackonkey: a temperatura de 35 °C durante 48 hr para el recuento total de bacterias coliformes.

6.- Recuento de colonias que sean levaduras y mohos proceder según NB 32004, para las bacterias mesófitas NB 32003, y para coliformes basarse en la NB 32005.

## **ANEXO 4**

### **DATOS DE LA MUESTRA PATRÓN**

#### **Datos técnicos**

- ✓ Fácil de usar
- ✓ Altamente soluble, aun en agua fría
- ✓ Baja viscosidad
- ✓ Transparente y claro en agua
- ✓ Estable a través un amplio rango de pH
- ✓ Estable durante tratamientos térmicos
- ✓ Color blanco a crema claro
- ✓ Polvo sin partículas finas
- ✓ Polvo de excelente fluidez y propiedades de compresión
- ✓ Grado alimenticio

#### **Producción**

- ✓ Producido en Angoulême, Francia Proceso enzimático eficiente
- ✓ HACCP
- ✓ ISO 9001
- ✓ Completa trazabilidad

## COMPOSICIÓN DE AMINOÁCIDOS PRESENTES

<b>Amino-Ácidos (g/100g proteína)</b>	<b>Péptidos de Colágeno de piel de pescado</b>
<b>Alanine</b>	9.5
<b>Arginine</b>	8.9
<b>Asparbic acid</b>	6.0
<b>Glutamicacid</b>	11.5
<b>Glycine</b>	21.2
<b>Histidine</b>	1.1
<b>Hydroxylysine</b>	1.0
<b>Hydroxyproline</b>	10.1
<b>Isoleucine</b>	1.1
<b>Leucine</b>	2.7
<b>Lysine</b>	3.4
<b>Methoinine</b>	1.4
<b>PhenYlalanine</b>	2.0
<b>Proline</b>	10.7
<b>Serine</b>	3.7
<b>Threonine</b>	2.9
<b>Tyrosine</b>	0.3
<b>Valine*</b>	2.2

ANEXO 5

CUADRO I

ÁREA DE APLICACIÓN Y FASE ETARIA	LÍMITES DE ACEPTABILIDAD
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Productos para uso infantil.</li> <li>▪ Productos para Área de ojos.</li> <li>▪ Productos que entran en contacto con las membranas mucosas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>a. Recuento de microorganismos mesófilos aerobios totales. Límite máximo <math>1 \times 10^2</math> UFC/g o ml.</li> <li>b. Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en 1g o ml.</li> <li>c. Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> en 1g o ml.</li> <li>d. Ausencia de <i>Coliformes totales</i>, en 1g o ml.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Demás productos cosméticos susceptibles de contaminación microbiológica.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>a. Recuento de microorganismos mesófilos aerobios totales. Límite máximo <math>1 \times 10^3</math> UFC/g o ml.</li> <li>b. Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en 1g o ml.</li> <li>c. Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> en 1g o ml.</li> <li>d. Ausencia de <i>Coliformes totales</i>, en 1g o ml.</li> </ul>

CUADRO II

CONDICIÓN	LÍMITE
pH ácido	$\leq 3,0$
pH alcalino	$\geq 10,0$
Soluciones hidroalcohólicas	$\geq 20 \%$
Temperatura de llenado	$\geq 65,0 \text{ }^\circ\text{C}$
Actividad del agua ( $a_w$ )	$\leq 0,75$
Productos de base solvente	Sin límite
Productos oxidantes	Sin límite
Clorhidrato de aluminio y sales relacionadas	15% al 25 %