

## OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNA HIDROLIZADA A PARTIR DE LA RASPA RESIDUAL DEL PROCESO DE CURTIDO DE PIELS

Estefany Abigail Garduño Cruces<sup>1</sup>, Javier Antonio Arcibar Orozco<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad De la Salle Bajío, <sup>2</sup>Centro de Innovación Aplicada en Tecnologías Competitivas.  
stefygard@gmail.com; jarcibar@ciatec.mx

### RESUMEN

León, Guanajuato es reconocido a nivel nacional por la calidad en la curtiduría, generando hasta el 86 % del P.I.B. estatal. Los residuos derivados de cuero curtido conteniendo sales de cromo(III), tienen un potencial peligroso si son manejados inadecuadamente ya que pueden oxidarse a cromo(VI) el cual es tóxico para los seres vivos y un comprobado carcinogénico. Con el objetivo de contribuir en la sostenibilidad del proceso de curtido, se diseñan procesos para aprovechar sus residuos y convertirlos en productos de valor agregado. Se propone la extracción de cromo mediante una hidrólisis básica con agentes complejantes. La extracción es una hidrólisis de material proteínico proveniente de las fibras colagénicas de raspa. La presente investigación determina la concentración de colágeno hidrolizado. La raspa se obtuvo de una tenería local, fue acondicionada para el proceso de extracción. Se probaron 8 condiciones de hidrólisis a base de  $\text{KC}_4\text{H}_5\text{O}_6$  y NaOH por 24 h, 25 °C y 250 rpm, seguida de una precipitación química con HCl 1.0M para separar el cromo en forma de sales y un proceso de filtración. Se obtuvo producto proteico sólido y proteína hidrolizada líquida. El análisis de muestra sólida con FT-IR presentó enlaces de vibración entre 1500 a 1850  $\text{cm}^{-1}$ . En las proteínas, el grupo amida (C=O) aparece alrededor de 1650  $\text{cm}^{-1}$ . El método de Bradford proporcionó concentraciones de proteína hidrolizada en producto líquido por condición evaluada: 69.80 g/L (NaOH 1.0M / $\text{KC}_4\text{H}_5\text{O}_6$  2.5M), 61.10 g/L (NaOH 0.1M / $\text{KC}_4\text{H}_5\text{O}_6$  2.5M), 30.95 g/L (NaOH 0.05M / $\text{KC}_4\text{H}_5\text{O}_6$  0.5M) y 10 g/L (NaOH 0.8M), 4.7 g/L (NaOH 1.7 M / $\text{KC}_4\text{H}_5\text{O}_6$  1.5 M), 1.0 g/L (NaOH 0.5M / $\text{KC}_4\text{H}_5\text{O}_6$  3.1M), 0.0 (NaOH 0.17M / $\text{KC}_4\text{H}_5\text{O}_6$  1.5 M), 0.0 (NaOH 5 M / $\text{KC}_4\text{H}_5\text{O}_6$  3.1 M). Aplicando cromatografía iónica con detector electroquímico *Gold AAA aminoacids* se obtuvieron las concentraciones de aminoácidos predominantes: aspartato 0.315 g/L, glutamato 1.314 g/L, tirosina 1.187 g/L (NaOH 1.0M / $\text{KC}_4\text{H}_5\text{O}_6$  2.5M); aspartato 0.28 g/L, glutamato 0.67 g/L, tirosina 1.0 g/L (NaOH 0.1M / $\text{KC}_4\text{H}_5\text{O}_6$  2.5M); aspartato 0.16 g/L, glutamato 1.44 g/L, tirosina 0.02 g/L (NaOH 0.05M / $\text{KC}_4\text{H}_5\text{O}_6$  0.5M); aspartato 0.22 g/L, glutamato 0.70 g/L, tirosina 2.40 g/L (NaOH 0.8M); aspartato 1.15 g/L, tirosina 0.69 g/L (NaOH 1.7 M / $\text{KC}_4\text{H}_5\text{O}_6$  1.5 M); aspartato 0.28 g/L, glutamato 0.78 g/L (NaOH 0.5M / $\text{KC}_4\text{H}_5\text{O}_6$  3.1M); aspartato 0.37 g/L, glutamato 0.93 g/L, tirosina 2.72 g/L (NaOH 0.17M / $\text{KC}_4\text{H}_5\text{O}_6$  1.5 M); y aspartato 0.31 g/L, glutamato 0.09 g/L, tirosina 0.70 g/L (NaOH 5 M / $\text{KC}_4\text{H}_5\text{O}_6$  3.1 M). Tienen potencial para aplicarse en la industria cosmética y agrícola. El presente demuestra que es posible extraer cromo para su revalorización y la proteína hidrolizada se encuentra principalmente como aminoácidos, los cuales tienen un valor comercial importante.

### INTRODUCCIÓN

Se identifica con el nombre de raspa a los sólidos generados en la etapa de raspado o rebajado de cuero [1]. El componente aprovechable de la raspa de cuero, en esta investigación, es la parte proteínica en la cual se encuentra el colágeno y cuya obtención se destinaría a otros sectores industriales como el cosmético y el agrícola. Investigaciones consultadas reportan el tratamiento de extracción de proteína hidrolizada llevando a cabo la hidrólisis alcalina seguida de hidrólisis ácida con residuos del curtido [2], donde se analiza la variación de concentración de NaOH, demostrando que es el factor más influyente en la disolución de cromo en la hidrólisis alcalina [3]. Se decide utilizar el reactivo NaOH, acompañado de un asistente de hidrólisis:  $\text{KC}_4\text{H}_5\text{O}_6$  (tartrato de potasio). El  $\text{KC}_4\text{H}_5\text{O}_6$  no rompe por sí sólo los enlaces cromo-colágeno, sin embargo, este ligando juega varios papeles importantes los cuales son [4]: 1) Agente estabilizante del cromo, 2) Agente promotor que incrementa la extracción del cromo y 3) Agente protector para la estructura fibrosa de la matriz orgánica proteica.

## TEORÍA

Se ha cuantificado que de una tonelada de piel salada se obtienen alrededor de 200 kg de piel curtida y más de 600 kg de productos sólidos de desecho y subproductos [1,4]. Es decir, entre el 40 y 50% de las pieles y cueros es desechado en la operación de raspado o rebajado, s [1,4]. La raspa representa un 75% de los desechos sólidos que contienen cromo y normalmente termina depositado en tiraderos. Ésta se caracteriza por presentar un 47.25% de humedad, 14.92% de nitrógeno, 82.82% de proteínas, 3.77% de óxido de cromo, 9.12% de cenizas totales y 2.27% de grasas extraíbles [5].

Las proteínas están constituidas por largas cadenas de aminoácidos, que a su vez están constituidos por un grupo amino, grupo carboxilo, un hidrógeno y una cadena ramificada unidos a un carbono quiral. Un aminoácido es la unidad estructural de las proteínas y se compone de un grupo carboxilo, un grupo amino, una cadena ramificada y un hidrógeno. Los aminoácidos se unen formando cadenas peptídicas que pueden ser oligopéptidos, constituidos de 2 a 10 aminoácidos y polipéptidos, de 10 a 50 aminoácidos, a su vez, las proteínas contienen más de 50 aminoácidos en cadena [6].

El colágeno es un tipo de proteína fibrosa formada por tres cadenas polipeptídicas (1000 aminoácidos por cadena) en triple hélice. Es una de las estructuras proteicas más abundantes en todos los animales. Existen 28 tipos de colágeno detectados en animales vertebrados, los cuales están compuestos por al menos 46 cadenas de polipéptidos identificados [7]. La cadena de triple hélice presenta al menos 1400 aminoácidos, de los cuales la glicina (Gly) corresponde aproximadamente un 33%. La Imagen 1 muestra una descripción detallada de su composición. El resto son otro tipo de aminoácidos entre los que destacan la hidroxiprolina e hidroxilisina, que son únicos para el colágeno [7].

La hidrólisis se refiere a la disociación de una sal en agua, es decir, los iones que la conforman interactúan con el agua liberándose de la molécula de origen (las sales) aumentando así la concentración de iones hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ). Si se trata de la disociación de una base en agua, el pH es mayor a 7. En contraste, si se disocia un ácido en agua, el pH es menor a 7. Se identifican dos tipos de hidrólisis según sea el tipo de ion que interactúa con el agua: hidrólisis ácida, cuando interactúan cationes, y la hidrólisis alcalina cuando interactúan aniones.

La presencia de complejos de colágeno-cromo en la raspa residual del cuero se deriva por el tratamiento mismo de curtido, con sales de cromo [8]. Debido a que se ajusta a un pH ácido en el proceso de piquelado, los poros de la piel se abren haciendo que el cromo logre adentrarse a la estructura del colágeno y otorgarle las propiedades de durabilidad. El cromo reacciona con el colágeno de la piel a través de los iones hidrógeno ( $\text{H}^+$ ) del colágeno protonado y el grupo oxidrilo ( $\text{OH}^-$ ) de la sal básica del cromo lo cual provoca que se combine con grupos funcionales de al menos dos de las tres cadenas polipeptídicas que conforman el colágeno [8].

En la reacción de hidrólisis se necesita utilizar un agente extrayente fuerte para poder separar las cadenas peptídicas del colágeno de la raspa unido al cromo presente como complejo. El agente extrayente en la hidrólisis de proteína se compone de dos sustancias: tartrato de potasio ( $\text{KC}_4\text{H}_5\text{O}_6$ ) e hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ). El  $\text{KC}_4\text{H}_5\text{O}_6$  es seleccionado ya que tiene la función de generar compuestos quelantes al interactuar con el cromo, es decir, produce un compuesto estable por la formación de anillos con un solo átomo metálico el cuál es sencillo de separar una vez terminado el proceso de hidrólisis. Los iones metálicos se comparan con los iones de hidrógeno libres como catalizadores de la hidrólisis de diversos compuestos orgánicos. Los quelatos se forman entre el ion metálico y el compuesto que sufre el cambio químico, o con el oligoelemento transportado (en este caso el cromo(III)) por el agente quelante (el tartrato de potasio) [9]. La selección del  $\text{NaOH}$  es que, como un agente alcalino fuerte, genera una hidrólisis a pH entre 11 a 13, lo cual es ventajoso ya que obtiene óxido de cromo (III) en el precipitado y facilita la separación de materia proteica hidrolizada en el filtrado líquido [9,10].

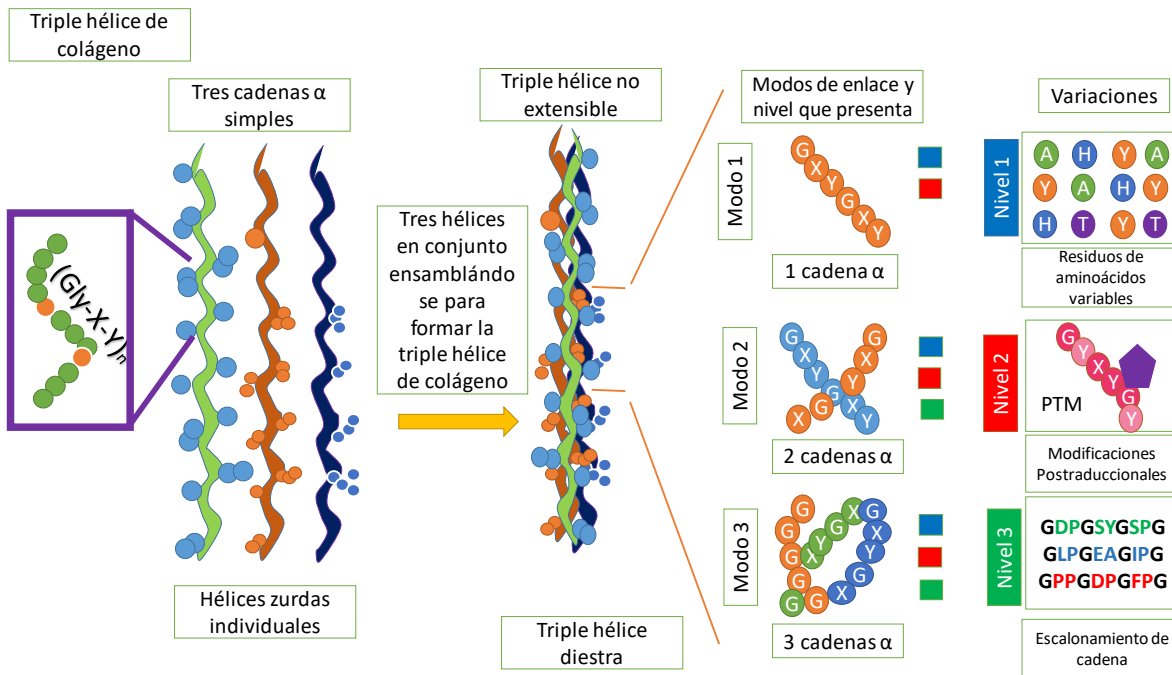


Imagen 1. Tres hélices zurdas iniciales (cadenas α) se unen y ensamblan fuertemente debido a los residuos de aminoácidos de glicina (Gly), formando una hélice diestra. Al asociarse, se reestablece la no extensibilidad de la estructura y la combinación de las tres cadenas individuales (cadenas α) se puede dar en tres modos de enlace (una, dos o tres cadenas) con tres niveles de variación de estos modos de enlace. Nivel 1: 20 tipos de aminoácidos en combinación variable; nivel 2: modificaciones postraduccionales (PTM por sus siglas en inglés), y nivel 3: escalonamiento de las cadenas en triple unión. Estas cadenas unidas especifican los diversos modos de enlace posibles que toman lugar a lo largo de la cadena de triple hélice en cualquiera de los 28 tipos de colágeno para unir varias macromoléculas [7,8,10].

### METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Inicialmente, se recibió la raspa nativa aplicando pruebas de porcentaje humedad de la raspa recién recolectada por triplicado tomando muestras de raspa nativa con masa de entre 1 y 2 gramos. Se evaluó el porcentaje de humedad teniendo en promedio 55.69%.

Se realizaron 5 lavados de 40 g de raspa con un litro de agua de la llave (tres veces) y 1 litro de agua desionizada (2 veces). Se filtró al vacío la raspa lavada en el matraz kitazato colocando el embudo de Buchner con un papel filtro dentro para poder vaciar la raspa lavada. Se separó en charolas de aluminio y se sometió a secado en estufa de calentamiento a 80 – 85 °C durante 48 h. La raspa seca se molió en mortero y se tamizó. El tamaño de partícula utilizado fue de 500 μm. La raspa tamizada se somete a secado nuevamente por 60 minutos a 80 °C.

Cada una de las condiciones de concentración de agente extrayente para las diferentes reacciones de hidrólisis, se llevaron a cabo de la siguiente manera: se añadieron 5 g de raspa seca con tamaño de partícula de 500 μm a un vaso de precipitado de 250 ml. Después se vació la dilución con volumen de 100 ml de la concentración seleccionada del agente extrayente. Se colocó un agitador magnético para dejar la reacción en parrilla de agitación por un periodo de 24 horas, 250 rpm a temperatura ambiente. Al finalizar cada reacción, se neutralizó la reacción a pH 8 con HCl 1.0 M y se procedió a la filtración por gravedad, para separar el producto líquido del sólido.

Tabla 1. La extracción de proteína hidrolizada conlleva 8 condiciones de agente extrayente de NaOH y  $KC_4H_5O_6$ .

Condición	NaOH (M)	$KC_4H_5O_6$ (M)
C1	0.8	-
C2	0.17	1.5
C3	0.1	2.5
C4	0.5	3.1
C5	0.05	0.5
C6	1.7	1.5
C7	1	2.5
C8	5	3.1

El producto sólido, “pastel de cromo”, fue sometido a secado a 85 °C por 24 h. El producto líquido se sometió a hidrólisis ácida cuidando que el pH se mantenga en 4, se filtró en el sistema *Millipore* usando membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  con el fin de separar las sales de cromo formadas en el licor proteico después de la hidrólisis ácida cuyo peso molecular mayor hace que precipiten en el fondo de los tubos de ensaye. Se utiliza un sistema de filtración *Millipore* hasta obtener solución cristalina.



Imagen 2. Hidrólisis ácida con HCl 1.0 M de licor proteico seguida de un proceso de filtración en *Millipore*. En la membrana de 0.4  $\mu\text{m}$  se quedan atrapados los compuestos y sales de cromo, por lo que una vez filtrado, el líquido se va volviendo transparente y cristalino.

Cada producto líquido obtenido en diferente condición de concentraciones de NaOH /  $KC_4H_5O_6$  para reacción de hidrólisis, fue evaluado por método de Bradford utilizando el espectrofotómetro UV-VIS para cuantificar la concentración de proteína diluida. Se utilizó el reactivo de Bradford Protein Assay, Bio-Rad, cat.: 500-0006 y albúmina sérica bovina (ASB) 22%. Se elaboró una curva estándar de proteína preparando el stock de albúmina en una concentración de 1 mg/ml (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). En cuanto al producto líquido, éste fue sometido a proceso de secado por 24 h, pulverizado en mortero normal y mortero de Ágata para obtener materia particulada y evaluar estructura en Espectrofotometría Infrarrojo. Se procedió a realizar diluciones 1:10 de cada producto líquido obtenido para la separación y cuantificación de aminoácidos presentes mediante cromatografía de intercambio iónico (columna Dionex Amino Pac PA10 (4X250 mm), eluentes agua tipo I, NaOH 0.25 M y NaAce (acetato de sodio) 1.0 M). En seguida, se cuantificó la cantidad de cromo diluido en cada uno de los hidrolizados líquidos mismos. Se inició con una digestión de 10 ml de cada muestra con ácido clorhídrico (HCl) y ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) concentrado en una proporción 5:1, dejándose en calentamiento entre 80 a 90 °C terminando digestión al bullir la solución. Finalmente, se realizaron diluciones 1:10 de producto líquido digerido para evaluarlos en el equipo de espectroscopía de absorción atómica.

## RESULTADOS

La imagen 3 muestra las operaciones realizadas para el proceso de extracción de proteína hidrolizada de la raspa de cuero. Al momento de hacer reaccionar la raspa con una solución extrayente de NaOH/KC<sub>4</sub>H<sub>5</sub>O<sub>6</sub>, se provoca un incremento de pH haciendo el medio alcalino, facilitando el rompimiento del colágeno. Tal como se muestra en la Imagen 4, la extracción del cromo por hidrólisis se puede plantear en dos fases:

- a) Fase 1: Los grupos hidroxilo y agua dan comienzo a la desestabilización de los enlaces químicos del complejo cromo-colágeno. Inicialmente ocurren ataques nucleofílicos (el elemento metálico es ácido, ocurre cuando el complejo es catiónico) provocados por los ligandos hidroxilo (OH<sup>-</sup>), sobre los átomos de cromo, seguido de ataques electrofílicos (ocurre una vez que el complejo es aniónico) por ligandos de agua (H<sub>2</sub>O) sobre los puentes de oxígeno [11,12].
- b) Fase 2: Los ligandos de KC<sub>4</sub>H<sub>5</sub>O<sub>6</sub> reaccionan con los átomos de cromo, causando su enmascaramiento (complejación) de cromo. Ésta interacción química evita la precipitación del cromo dentro de la matriz orgánica de los residuos de raspa promoviendo su difusión en la reacción de hidrólisis por la formación del compuesto adicional cromo-tartrato [11,12].

Los enlaces covalentes no peptídicos son los primeros en romperse, despolimerizando las multicadenas de la piel que queda en la raspa, posteriormente se rompen los enlaces peptídicos y finalmente los enlaces que dan lugar a los aminoácidos presentes en la triple hélice [13]. Involucra el romper los enlaces responsables de la estabilidad del cuero colágeno-cromo que son:

- a) Enlaces nativos cruzados, enlaces covalentes formados por un grupo carboxilo (aldehído) de la lisina y un grupo amino de la hidroxilisina de otra fibra que otorga elasticidad al colágeno [14].
- b) Enlaces colágeno-cromo, los cuales son resultado de enlaces covalentes entre el ion de cromo en complejo (complejo de cromo) y grupos carboxilo ionizados del ácido aspártico y ácido glutámico entre las cadenas del colágeno [2,14, 15].

Parte de los iones de cromo del complejo: colágeno-Cr quedan disponibles para ser intercambiados con los grupos oxhidrilo del agente hidrolizante y formar sales y óxidos de cromo [15,16]. La reacción de los complejos con NaOH produce Cr(OH)<sub>3</sub> de baja solubilidad, que junto con el uso de tartrato de potasio previene la formación de sólidos, provocando así que el ion simple Cr(III) precipite y se remueva fácilmente de la solución acuosa. Se ha reportado que hay un máximo de recuperación de cromo a pH 8 y NaOH como agente precipitante [15,16], El producto líquido, separado por filtración por gravedad, es rico en aminoácidos, pero también aún presenta cromo disuelto. Se ha reportado que, para poder separar la fracción de cromo diluida del colágeno hidrolizado, se puede aplicar hidrólisis ácida que a su vez favorece la precipitación ácida del cromo [10,13,15]. El uso de ácidos para provocar una hidrólisis adicional de productos hidrolizados alcalinamente genera la obtención de productos proteicos de bajo peso molecular [13,15], ya sea cadenas peptídicas o aminoácidos. Se provocó una hidrólisis ácida con HCl 1.0 M a pH 4 las muestras se dejaron reposar entre 12 a 24 h en cuarto frío, posteriormente se observaron partículas de cromo. En base a análisis FT-IR descritos más adelante, el sólido se compone de una mezcla de Cr(OH)<sub>3</sub>(hidróxido de cromo (III)) y CrCl<sub>2</sub> (cloruro de cromo (II)) [15,16]. Con esto se observaba más cristalinidad en la muestra líquida. Entre más cristalina esté la solución con contenido proteico, indica que la presencia de sales de cromo es menor.

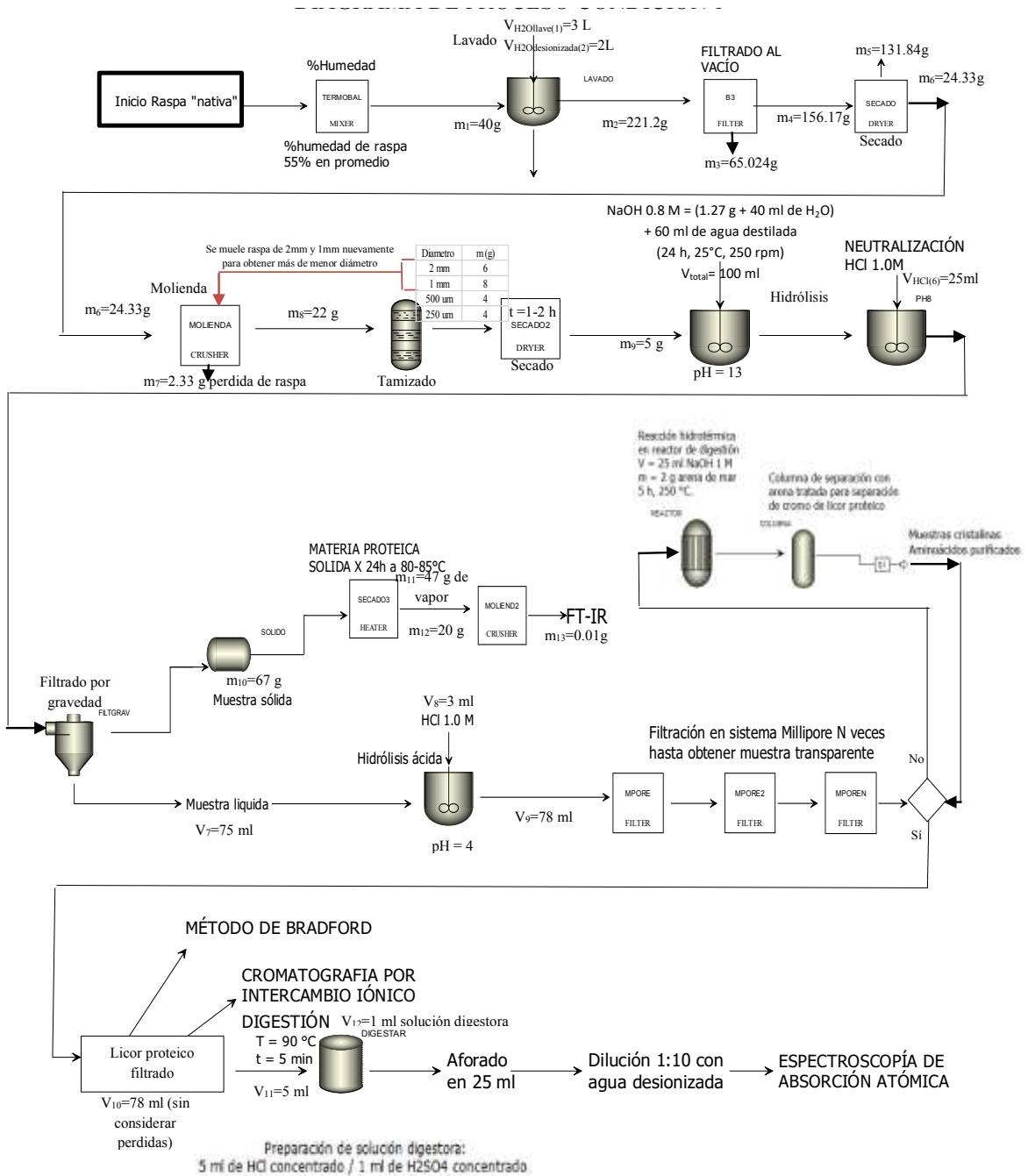


Imagen 3. El diagrama de proceso aplicado en esta investigación abarca las siguientes operaciones: obtención de raspa de cuero, porcentaje de humedad de la raspa nativa, lavados, filtración al vacío, secado, molienda, tamizado, reacción de hidrolisis, neutralización de la reacción de hidrólisis a base de NaOH y  $\text{KC}_4\text{H}_5\text{O}_6$ , filtración por gravedad, secado de producto sólido filtrado, hidrólisis ácida de producto líquido, filtración al vacío de producto líquido, cuantificación de proteínas del producto líquido, cromatografía de intercambio iónico, digestión de muestras con HCl y  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , lectura en espectroscopio de adsorción atómica para cuantificación de cromo.

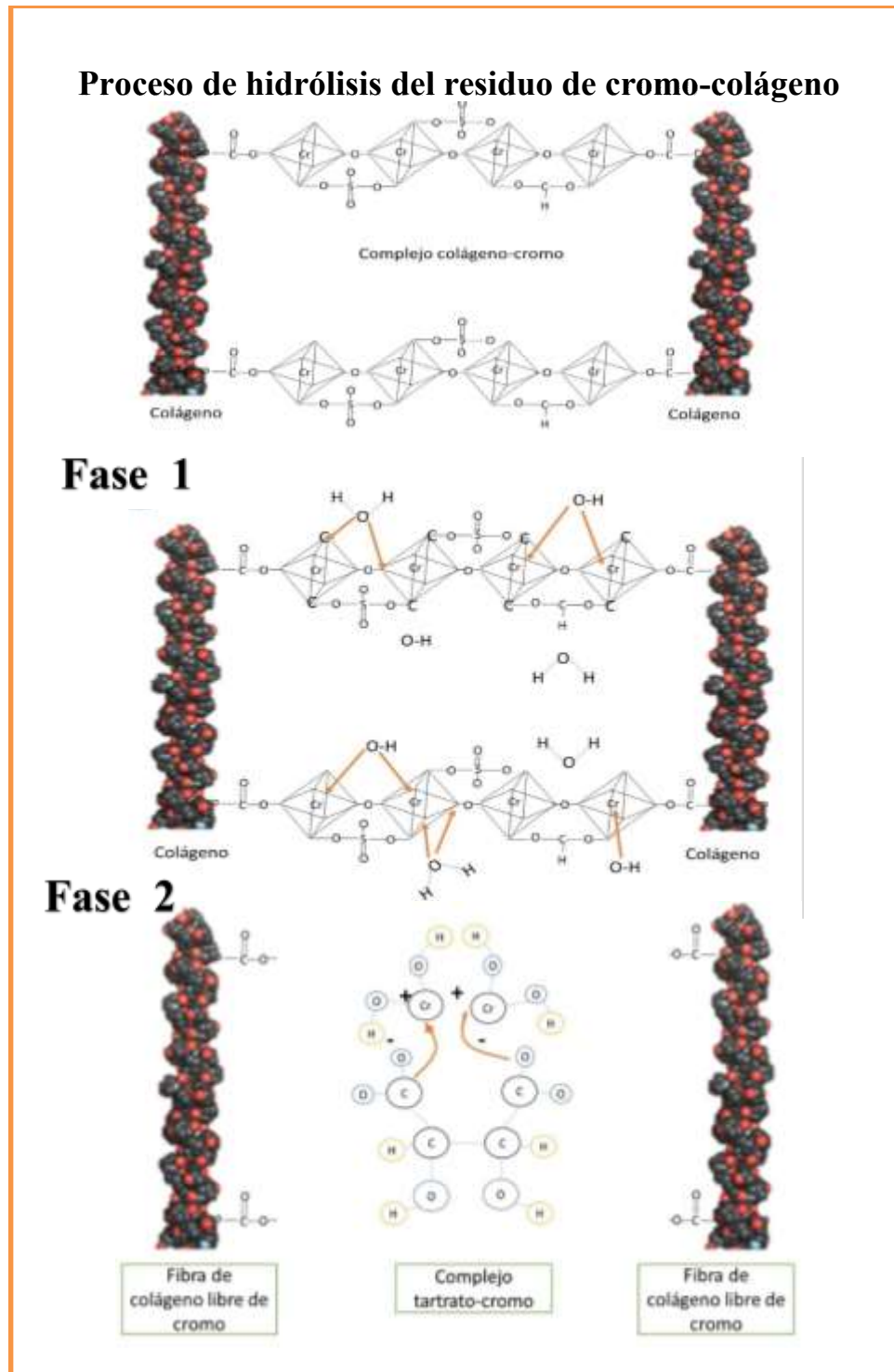


Imagen 4. Mecanismo de acción de la reacción de hidrólisis a base de NaOH y  $KC_4H_5O_6$  [2,4,16].

Tabla 2. Separación de aminoácidos hidrolizados en las 8 condiciones de hidrólisis. Se señala el tiempo de retención para cada uno de los aminoácidos por reacción, así como la concentración en solución 1:10 de hidrólisis. A cada aminoácido le fue asignado un número para su identificación.

Condición de hidrólisis	Aminoácidos	[g/L]	Condición de hidrólisis	Aminoácidos	[g/L]
1	Asp (1)	0.225	5	Asp (1)	0.164
1	Cis (2)	0.018	5	Cis (2)	0.000
1	Glu (3)	0.704	5	Glu (3)	1.444
1	Hys (4)	0.018	5	Hys (4)	0.010
1	Met (5)	0.006	5	Met (5)	0.005
1	Tyr (6)	2.401	5	Tyr (6)	0.029
2	Asp (1)	0.377	6	Asp (1)	0.000
2	Cis (2)	0.039	6	Cis (2)	0.003
2	Glu (3)	0.933	6	Glu(3)	1.156
2	Hys (4)	0.003	6	Hys (4)	0.135
2	Met (5)	0.006	6	Met (5)	0.006
2	Tyr (6)	2.725	6	Tyr (6)	0.698
3	Asp (1)	0.289	7	Asp (1)	0.316
3	Cis (2)	0.000	7	Cis (2)	0.001
3	Glu (3)	0.667	7	Glu (3)	1.314
3	Hys (4)	0.138	7	Hys (4)	0.008
3	Met (5)	0.006	7	Met (5)	0.006
3	Tyr (6)	1.000	7	Tyr (6)	1.188
4	Asp (1)	0.288	8	Asp (1)	0.316
4	Cis (2)	0.000	8	Cis (2)	0.000
4	Glu (3)	0.788	8	Glu (3)	0.092
4	Hys (4)	0.074	8	Hys (4)	0.009
4	Met (5)	0.006	8	Met (5)	0.006
4	Tyr (6)	0.000	8	Tyr (6)	0.704

Al producto líquido, obtenida de la operación de filtración con *Millipore* mostrado en la Imagen 3, le fue cuantificada la concentración de aminoácidos hidrolizados en cada condición de reacción de hidrólisis por método de Bradford. Se realiza un análisis con un diagrama de Pareto para determinar que condición es la que genera un mayor rendimiento en la concentración de proteína hidrolizada (Imagen 5A) donde se visualiza que la condición 7 presenta la mayor concentración de proteína hidrolizada con 69.80 g/L (NaOH 1.0M / $KC_4H_5O_6$  2.5M), seguida de la condición 3 con 61.10 g/L (NaOH 0.1M / $KC_4H_5O_6$  2.5M). El resto de las condiciones son 30.95 g/L (NaOH 0.05M / $KC_4H_5O_6$  0.5M), 10 g/L (NaOH 0.8M), 4.7 g/L (NaOH 1.7 M / $KC_4H_5O_6$  1.5 M), 1.0 g/L (NaOH 0.5M / $KC_4H_5O_6$  3.1M), -4.0 (NaOH 0.17M / $KC_4H_5O_6$  1.5 M), -4.0 (NaOH 5 M / $KC_4H_5O_6$  3.1 M). La condición 7 contenía NaOH 1.0 M /  $KC_4H_5O_6$  2.5 M, por tanto, en base a estudios previos [10,16], es posible que las proporciones de tartrato de potasio e hidróxido de sodio utilizadas hayan favorecido en la recuperación de proteína hidrolizada, esto debido a que, el tartrato, por estar en mayor proporción, incrementa la protección de la estructura fibrosa de la matriz orgánica proteica [10,16] promoviendo, al mismo tiempo, la extracción de cromo en conjunto con el hidróxido de sodio que es el agente extrayente [7,13, 16]. Por cromatografía por intercambio iónico fueron identificados en todas las muestras los aminoácidos aspartato (Asp), cisteína (Cys), glutamato (Glu), histidina (His), metionina (Met) y tirosina (Tyr) con diferente concentración. La Tabla 1 presenta las concentraciones y tiempos



de retención para cada uno de los aminoácidos separados en la columna. Los tiempos de retención coinciden a lo largo del análisis de las variaciones realizadas por lo que se confirma la presencia de los aminoácidos cuantificados a diferentes condiciones de hidrólisis [17, 18], aunque a diferentes rendimientos. La Tabla 2 presenta los cromatogramas obtenidos tanto de las soluciones estándar como para dos de los aminoácidos de mayor presencia en las soluciones de hidrolizados. Las diluciones realizadas para lectura en cromatógrafo fueron de 1:10. Se detectó la presencia de aminoácidos como arginina, triptófano, fenilalanina, entre otros, sin embargo, no se otorgó una lectura de concentración por parte del cromatograma para poderlos considerar, probablemente debido a ser muy reducida para su determinación por lo que se evalúa el rendimiento en concentración solo de los aminoácidos detectados.

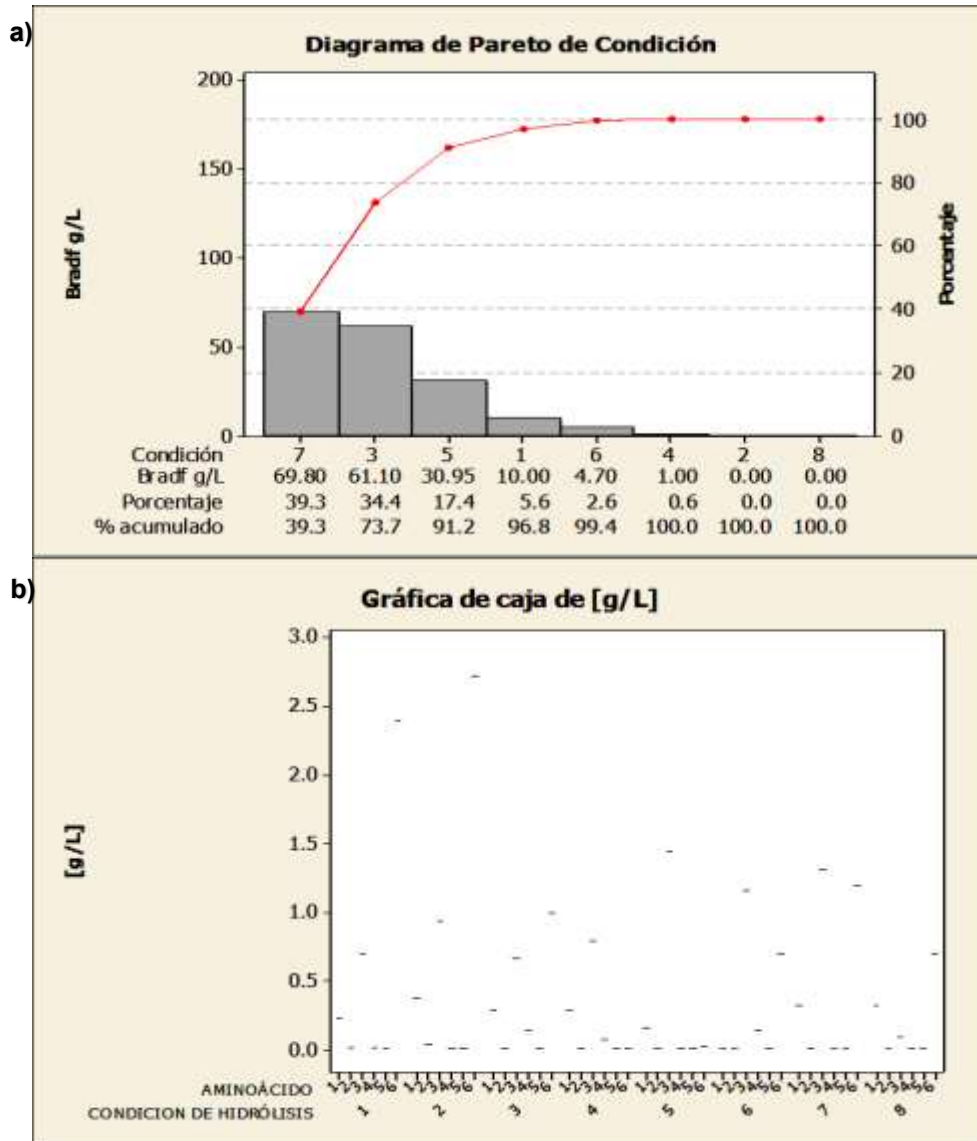


Imagen 5. A) Diagrama de Pareto para evaluación por condición de hidrolisis determinando la concentración de proteína en cada una de manera global sin discriminar por tipos de aminoácidos. B) Gráfica de cajas. Se indica cuáles fueron los aminoácidos de mayor concentración separados en la columna de cromatografía de intercambio iónico por condición de hidrólisis de NaOH/KC<sub>4</sub>H<sub>5</sub>O<sub>6</sub>. Asp (1), Cys (2), Glu (3), His (4), Met (5) y Tyr (6)

En la Imagen 5B, se describe que los aminoácidos aspartato, glutamato y tirosina fueron los predominantes. Se aprecia que los aminoácidos representativos en cada reacción son: Condición 1: aspartato 0.2248 g/L, glutamato 0.70391 g/L, tirosina 2.4008 g/L. Condición 2: aspartato 0.3774 g/L, glutamato 0.9328 g/L y tirosina 2.7248 g/L. Condición 3: aspartato 0.2888 g/L, glutamato 0.6668 g/L y tirosina 1.0 g/L. Condición 7: aspartato 0.31567 g/L, glutamato 1.3141 g/L y tirosina 1.1877 g/L. La concentración de cada uno de estos aminoácidos se ve influenciada por las hidrólisis desempeñadas. En el caso de la hidrólisis alcalina, puede desnaturalizar los aminoácidos serina y treonina. En cuanto a la hidrólisis ácida a base de ácido clorhídrico puede desnaturalizar aminoácidos como el triptófano y cisteína [17, 18].

La evaluación de composición del producto sólido filtrado se realizó utilizando el espectrofotometría de Infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) en un intervalo de 4000 a 500  $\text{cm}^{-1}$ , es decir, un nivel medio de infrarrojo (Mid-IR). Se determinó que la mayor cantidad de cromo queda atrapado en la materia sólida o “pastel de cromo” como se reporta en otros estudios realizados, presentándose a manera de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Cr}(\text{OH})_3$  y complejo cromo-tartrato. A pesar de que debe encontrarse una mayor cantidad de cromo, también habrá presencia de materia proteica, pero en una concentración menor [17, 19].

Se realizan lecturas de las condiciones en donde se tuvo mayor retención de cromo en la materia sólida, “pastel de cromo”, al momento de realizar filtración por gravedad para separación de producto líquido. Una vez que se ha secado por 24 h entre 85 y 90°C, se pulveriza para obtener una mínima cantidad, la cual es colocada en el lector del espectrofotómetro infrarrojo para determinar la estructura molecular [20, 21,22]. Se procede a presentar un análisis en la Tabla 3 y los posibles compuestos que el espectro infrarrojo detectó sobre el producto sólido de hidrólisis de proteína para las últimas condiciones, donde se comparan las atribuciones espectrales de número de onda ( $1/\text{cm}$ ) y tipo de vibración registradas con las obtenidas en la experimentación, así como el tipo de compuesto que está presente en el compuesto sólido filtrado. Las comparaciones que se presentan a continuación se realizan tomando de referencia los trabajos [23, 24, 25]. Se presentan vibraciones de tipo  $\nu$  (vibración de tensión o estiramiento),  $\nu_s$  (vibración simétrica) y  $\delta$  (vibración de deformación en el plano). Los espectros de las muestras sólidas en las condiciones 6, 7 y 8 de la Imagen 6 se atribuyen a los enlaces químicos presentes de restos de cadenas polipeptídicas, peptídicas y aminoácidos, así como compuestos de cromo derivados de la hidrólisis, los cuales, se encuentran en mayor proporción por el color verde-azul característico del “pastel de cromo” filtrado. El intervalo de 3450-3300  $\text{cm}^{-1}$  indica la presencia de grupos  $-\text{OH}$  parcialmente asimétricos [23]. Este rango se encuentra en todos los productos sólidos hidrolizados [23]. Conforme a la investigación [23,25], el intervalo 2500-2000  $\text{cm}^{-1}$  indica la presencia de vibraciones de estiramiento que pueden corresponder a los átomos de carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre. Hay gran posibilidad de que este rango se encuentre en todos los productos sólidos hidrolizados debido a la materia orgánica hidrolizada y acumulada por la raspa al pasar por hidrólisis. El intervalo de número de onda de 1650 a 1550  $\text{cm}^{-1}$  representa una degradación relativamente avanzada de péptidos básicos [23,25]. Los números de onda por debajo de 962  $\text{cm}^{-1}$  representa la presencia de cromo en la materia sólida, así como se incluyen posibles compuestos formados a base del intercambio iónico generado entre el tartrato de potasio, hidróxido de sodio y el ácido clorhídrico en la hidrólisis ácida [23, 25]. El complejo tartrato- cromo es posible que se encuentre dentro del número de onda por debajo de 1000  $\text{cm}^{-1}$  por la lectura que otorga el cromo, sin embargo, dependería mucho sobre el enlace que interactúe con el infrarrojo ya que si es enlace C-O del complejo tartrato-cromo, se puede encontrar en valores superiores de vibraciones.

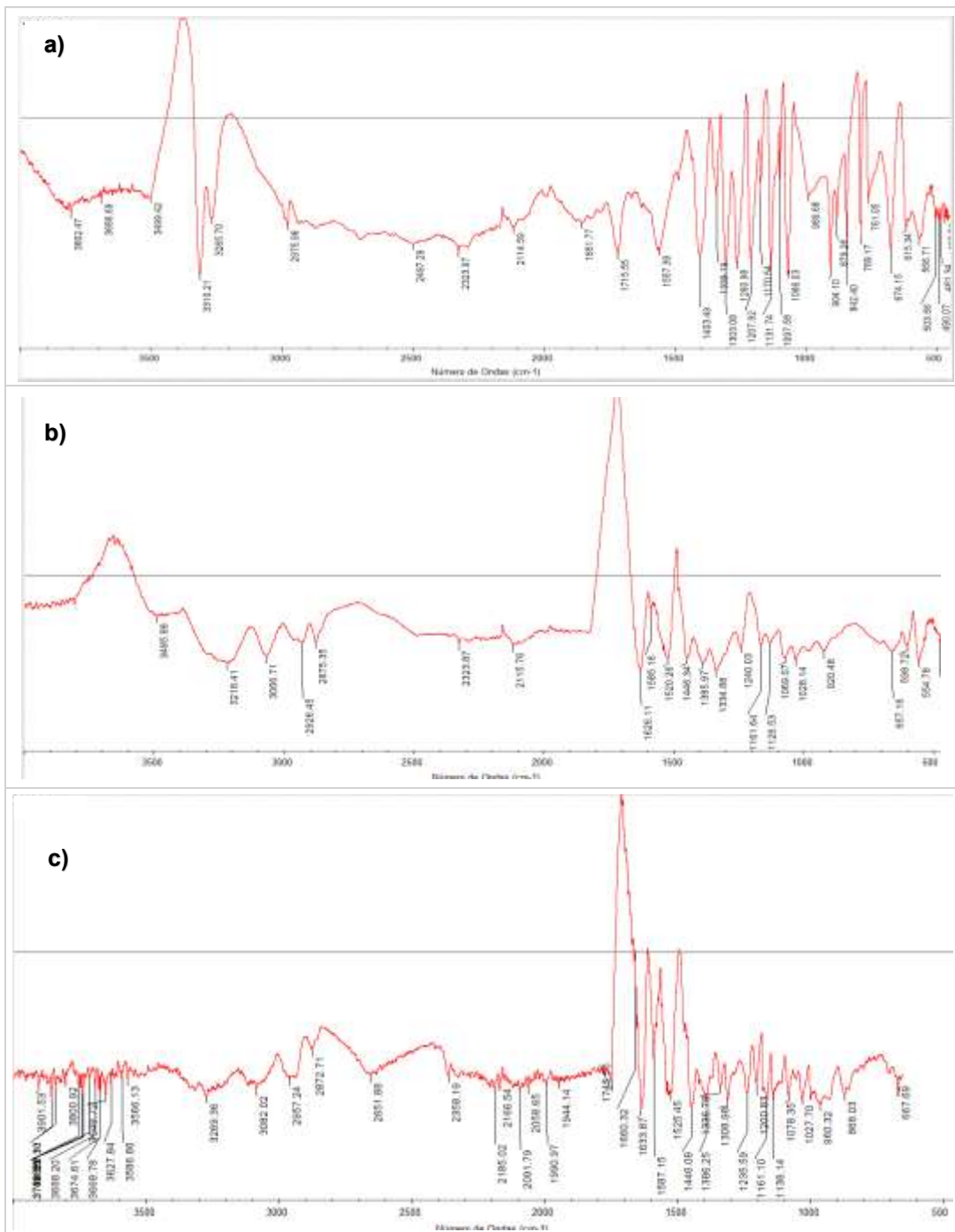


Imagen 6. Espectros FT-IR con línea base. a) Condición 6 (NaOH 1.7 M /  $KC_4H_5O_6$  1.5 M). b) condición 7 (NaOH 1.0 M /  $KC_4H_5O_6$  2.5 M) y c) condición 8 (NaOH 5.0 M /  $KC_4H_5O_6$  3.16 M).

Tabla 4. Números de onda (1/cm) obtenidos en espectros de FT-IR comparándolos con valores ya reportados para definir una atribución de compuestos presentes en el "pastel de cromo". [23, 24,25].

Condición 6		Condición 7		Condición 8	
No. de onda (1/cm)	Atribución	No. de onda (1/cm)	Atribución	No. de onda (1/cm)	Atribución
3686	OH de alcoholes y fenoles	3485	Enlaces intermoleculares de H en polipéptidos, histidinas, arginina, metioninas	3622	OH de alcohol
3499	Enlaces intermoleculares de H en polipéptidos, histidinas, arginina, metioninas	3218		3082	Aminoácidos
3310		3066		2957	Aldehídos
2975	Aldehídos	2926	Aldehídos	2872	Aldehídos
1715	Éteres aromáticos	2875		2651	Ácidos carboxílicos
1557	Aspartato - Glutamato	1626	Aminoácidos	2358	
1403	Prolina	1585	Aspartato-Glutamato	1745	Éteres aromáticos
1207	Tirosina	1446	Prolina	1660	Aminoácidos
1131	Trionina	1250	Tirosina	1582	Aspartato - Glutamato
1097	Serina	1161	Tirosina	1446	Prolina
1066	Serina	1126	Trionina	1235	Tirosina
879	Cromato de potasio (K <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub> )	1069	Serina	1200	Tirosina
615	Cromo	1028	Serina	1078	Serina
566	Cromo	554	Cromo	1027	Serina
503		868	Cromato de potasio (K <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub> )	960	Clorato de potasio (KClO <sub>3</sub> )

## CONCLUSIONES

Las concentraciones de NaOH 1.0M /KC<sub>4</sub>H<sub>5</sub>O<sub>6</sub> 2.5M otorgan la mayor cantidad de proteína hidrolizada siendo de 69.80 g/L. Los aminoácidos separados por cromatografía de intercambio iónico fueron Asp, Cys, Glu, His, Met y Tyr en producto líquido aprovechables para la industria cosmética y agrícola. El sólido analizado por espectrofotometría infrarrojo señala que después de la hidrólisis de la raspa, al ser filtrado por gravedad se retienen los componentes a base de cromo por lo que este puede ser aprovechado también para la producción de carbón activado o resinas para la industria de materiales. Esta investigación indica que es posible el aprovechamiento de un residuo de las curtidurías con potencial tóxico y obtener productos de valor agregado, al mismo tiempo, se aportaría con el manejo y control de residuos de las curtidurías dando un aporte a la economía circular entre ésta, el sector cosmético y agrícola.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. A. Estrada, "Recuperación de sales de cromo a partir de la raspa y su aplicación en el curtido de pieles". *Conciencia tecnológica*, 2013, pp. 24-28.
2. A. Sasia, "Recovery of collagen hydrolysates from chrome leather shaving tannery waste through two-step hydrolysis using magnesium oxide". *SLTE Journal*, 2019, pp. 80-84.
3. M. J. Ferreira, "Alkaline hydrolysis of chromium tanned leather scrap fibers and anaerobic biodegradation of the products". Springer Science Business, 2013, pp. 551-562.
4. A. Malek, "Chemical transformation of chromed leather wastes into environmentally harmless fibrous biomass". *Environment Protection Engineering*, 2016, pp. 179-192.
5. C. M. Reyes, "Recuperación de colágeno libre de cromo de los residuos sólidos postcurtición en la industria del cuero". *Magister en ciencia de la Ingeniería Ambiental*, 2016.
6. A. Lehninger, "Lehninger Principles of Biochemistry". Portland: W. H. Freeman. 2013, Capítulo 3-4.
7. A. L. Fidler, "The triple helix of collagens – an ancient protein structure". The company of biologists. Nashville, USA. 2018.
8. D. E. Arbeláez, "Precipitación del cromo y reutilización del agua de vertimientos de curtiembres de San Benito". Facultad de Ingeniería Ambiental. Universidad Santo Tomás. San Benito, Bogotá. 2014.
9. G. C. González, "Innovación tecnológica y curtiduría en el estado de Guanajuato". *Economía Informa*. 2017, pp 66-79.
10. A. Santos Ruíz, "El fenómeno de quelación en la bioquímica de los oligoelementos". Real Academia de Farmacia de Madrid. Madrid, España. 2000.
11. J. Beltrán Prieto, E. Vázquez. "Chromium recovery from solid leather waste by chemical treatment and optimisation by response surface methodology". *Chemistry and Ecology*, 2011, pp. 89-102.
12. S. P. Miranda, "Transformación de residuos de la curtiduría en productos de valor agregado. Recuperación de cromo y colágeno". Centro de Innovación Aplicada en Tecnologías Competitivas. León, Gto. 2019.
13. L. M. Martínez, "Aplicaciones del manual media a sectores industriales". Sector curtido de pieles animales. Madrid: Artes graficas mañas S. L. 1997.
14. H. A. Flores, "Virutas de cuero. Obtención de un adhesivo como sustituto de materiales ureicos". Facultad de Ingeniería Química. Universidad Nacional del Litoral. 2013.
15. B. Fitzpatrick, "Dermatología general en medicina general". 7ma edición. Panamericana. 2009 .pp. 526-528.
16. M. Shoulders, "Collagen structure and stability". *Annual Reviews. Biochemistry*. 2009, pp. 929-959.
17. P. Raven, & S. Singer, "Biology". USA: McGraw Hill. 2017. 11th edition.
18. J.C. Janson, "Protein purification. Principles, High Resolution Methods and Applications". New Jersey: Wiley. Parte II. 2011, Capítulo 4, pp. 93-131.
19. P. Palacios, T. Antequera, T. "A rapid and accurate extraction procedure for analysing free amino acids in meat samples by GC-MS". Hindawi publishing corporation. *International Journal of Analytical Chemistry*. 2015, pp. 1-7.
20. L. A. De la Rosa, "La microespectroscopía infrarrojo con transformada de Fourier en el estudio de sistemas biológicos". *Latinoamérica. Química*. 2013, pp. 125-148.
21. D. Wei, Z. Wenhua, "Dechroming of chromium-containing leather waste with low hydrolysis degree of collagen". *SLTC Journal*, 2018, pp. 129-133.
22. J. C. Janson, "Protein Purification. Principles, high resolution methods, and applications". . Hoboken: Wiley, 2011
23. J.C. García Pantoja, "Impacto ambiental generado en el proceso productivo de la empresa curtidos del oriente barrio San Benito Bogotá". Universidad de San Buenaventura. Facultad de Ciencias Empresariales. San Benito. 2006.
24. M. Niculescu, F. Laurentiu, "Extraction of the protein components as amino-acids hydrolysates from chrome leather wastes through hydrolytic process". *Chimie-Bucharest*, 2009, pp. 1070-1075.

25. "ATR-FT-IR spectra of conservation-related materials in the MID-IR and FAR-IR region". 2019. [Online]. [http://lisa.chem.ut.ee/IR\\_spectra/paint/pigments/chromium-oxide/](http://lisa.chem.ut.ee/IR_spectra/paint/pigments/chromium-oxide/) (accesado abril, 12,2020).
26. P. M. Cortez, "Espectroscopía infrarrojo para todos". CIATEJ. Guadalajara. 2017.
27. H.A. Flores, "Virutas de cuero. Obtención de un adhesivo como sustituto de materiales ureicos". Universidad Nacional del Litoral. 2001.
28. J.C. Janson, "Protein purification. Principles, High Resolution Methods and Applications". New Jersey: Wiley. Parte II. 2011, Capítulo 4, pp. 93-131.
29. T. P. Palacios, T. Antequera, "A rapid and accurate extraction procedure for analysing free amino acids in meat samples by GC-MS". Hindawi publishing corporation. International Journal of Analytical Chemistry. 2015, pp. 1-7.
30. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. "Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005". 2005.
31. A. Moral, "Depuración de Cromo III en aguas residuales que contienen alta carga proteica". Congreso Nacional de Medio Ambiente, 2014, pp. 1-10.