

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA, León
(UNAN-LEÓN)
FACULTAD DE CIENCIAS Y TECNOLOGIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



Estudio preliminar de extracción de queratina alfa soluble, mediante la combinación de los métodos Shindai y sulfuro sódico en pezuñas bovinas, para uso cosmético.

Tesis para optar al grado de:
Licenciados en Química

Autores:

- Haylin Jackarely Suárez Mejía.
- Madeling Gabriela López Mendoza.
- Roberto Benito Corea Jiménez.

Tutor:

Haylell Emilio Escoto López, M.Sc.

Asesor:

Jorge Isaac Cisne Altamirano, M.Sc.

León, septiembre 2021

¡A la libertad por la Universidad!

Dedicatoria

A mis padres Roberto y Martha por todo su esfuerzo realizado para ayudarme a alcanzar mis metas sé que no ha sido fácil pero con sus consejos y por impartirme los mejores valores he podido salir adelante como una persona de bien. A mis abuelos por su cariño, ternura y por haber ayudado a mis padres en mi formación porque para mí ha sido como unos segundos padres. A mi esposa Jackarely por haber sido mi apoyo en momentos difíciles por su amor incondicional y por ser la madre de mi hijo y la ayuda idónea de nuestro hogar. A mi suegra Yasmina Mejía por su cariño y estima que me tiene y a mi tío Orlando Corea le dedico esta tesis hasta el cielo donde está.

R. Corea

Llena de regocijo, de amor y esperanza dedico esta tesis a cada uno de mis seres queridos, quienes han sido mis pilares fundamentales para salir y seguir adelante. A mi madre Susana Mendoza porque ella es la mayor motivación en mi vida, por ser un gran ejemplo a seguir como persona y por su amor incondicional. A mi novio Jovanny Rivas que ha sido mi gran apoyo en los momentos difíciles y por ser unas de las pocas personas que creyó en mí. A mi padre Luis López y hermana Xochilt López por ser parte de mí y ser parte de su orgullo.

M. López

A mis padres en especial a mi madre Yasmina que ha sido incondicional en el transcurso de mi crecimiento, a mis abuelos María y José que han sido como mis segundos padres, a mi hijo, mi motivación principal para seguir adelante, a Roberto que ha sido un buen padre y esposo, juntos nos hemos motivado para lograr nuestras metas. A mis suegros que nos han apoyado incondicionalmente, a mis hermanos en especial a Kenner que siempre he querido ser un ejemplo para que continúe estudiando, que nada es imposible si uno se lo propone, y a cada persona que creyó en mí que si podía lograrlo y las que no también, porque fueron un motivo más para continuar.

H. Suarez

Agradecimiento

A Dios por guiarme en el camino del bien, por darme la fortaleza y la paciencia el amor a mi Carrera para seguir adelante en momentos difíciles y así culminar esta etapa de mi vida y lograr la licenciatura en química. A mis maestros del departamento de química por su arduo trabajo de transmitir sus conocimientos durante mi formación universitaria y por saber predicar con el ejemplo y de manera especial a los M.Sc Haylell Emilio Escoto López y Jorge Isaac Cisne Altamirano por todas las enseñanzas, orientación y apoyo que me brindo durante el desarrollo de este trabajo de titulación.

R. Corea

A Dios mi padre celestial por darme la fortaleza, sabiduría y entendimiento para poder culminar mi carrera que sin su ayuda no lo habría logrado. A mis padres por su apoyo, por sus consejos, valores y principios que me inculcaron a lo largo de mi vida, en especial a mi madre que ha sido mi mayor motivación, por siempre creer en mí y apoyarme sin importar mis errores. A mi novio por creer en mi capacidad y nunca dejarme sola en momentos difíciles, por su ayuda emocional y económica, y En especial a nuestro tutores M.Sc Haylell Escoto y Jorge Cisne por su paciencia y dedicación y por compartir sus conocimientos para el desarrollo de esta tesis

M. López

A Dios, el Divino niño Jesús por darme fortaleza y fe para continuar con mis estudios a pesar de las circunstancias, a cada uno de mis maestros por su empeño, esfuerzo y dedicación para compartirme sus conocimientos a lo largo de mi carrera, por cada regaño, corrección, y paciencia de explicarme cuando no entendía. De manera especial a M.Sc. Haylell Emilio Escoto López y M.Sc. Jorge Isaac Cisne Altamirano por su ayuda incondicional para culminar esta investigación. “Con la mezcla perfecta de tiza y desafíos, un profesor puede cambiar vidas. Gracias por cambiar la mía” Joyce Meyer. Por ultimo a mí, por nunca rendirme y superar cada prueba, cada obstáculo.

H. Suarez

viernes 13 de agosto de 2021

PhD. Sergio López Grío
Jefe Departamento de Química
FFCCTT
UNAN-LEON

Su Despacho:

Estimado Doctor López Grío:
Ante todo, reciba saludos muy atentos y cordiales de mi parte.

A través de la presente me dirijo a Usted para solicitar en mi calidad de tutor, su gestión para designar al tribunal examinador del trabajo monográfico titulado "Estudio preliminar de extracción de queratina alfa soluble, mediante la combinación de los métodos Shindai y sulfuro sódico en pezuñas bovinas, para uso cosmético.", presentados por los bachilleres **Haylin Jackarely Suárez Mejía con N° carnet 16-01367-0; Madeling Gabriela López Mendoza N° carnet 16-00636-0 y Roberto Benito Corea Jiménez N° carnet 16-02691-0.** para optar al título de Licenciado en Química.

Adjunto cartas de egresados, emitida por la oficina de registro central de esta alma mater.

No obstante, le pido por favor que la tesis sea revisada de manera expedita, y propongo como tribunal examinador a los profesores siguientes:

1. PhD. Sergio López Grío.
2. M.Sc. Manuel Vanegas Carvajal.
3. PhD. Ernestina Soto Sarria.

Agradeciendo de antemano su amable atención y deseándole éxitos en sus funciones le saludo.

Atentamente,


Haylell Emilio Escoto López
Departamento de Química.
FFCCTT
UNAN-LEON

CC. Archivo.

Índice

| | |
|--|----|
| 1. Introducción | 3 |
| 1.1 Planteamiento de problema | 5 |
| 1.2 Justificación | 6 |
| 2 Objetivos | 7 |
| 2.1 Objetivo general..... | 7 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 7 |
| 3 Marco teórico | 8 |
| 3.1 Materia prima | 8 |
| 3.1.1 Pezuñas bovinas..... | 8 |
| 3.2 Las proteínas | 8 |
| 3.2.1 Características de las proteínas..... | 9 |
| 3.2.2 Estructura de las proteínas..... | 9 |
| 3.3 Queratina | 13 |
| 3.3.1 Estructura de la queratina..... | 14 |
| 3.3.2 Reacciones químicas de la queratina:..... | 16 |
| 3.3.3 Reductores y oxidantes de la queratina..... | 17 |
| 3.3.4 Usos de la queratina..... | 18 |
| 3.3.5 Pruebas físicas de la queratina alfa-soluble..... | 19 |
| 3.3.6 Pruebas químicas de la queratina alfa-soluble..... | 19 |
| 3.3.7 Pruebas organolépticas a la muestra..... | 19 |
| 3.4 Valores de referencia de Queratina Alfa soluble | 20 |
| 3.5 Análisis estadístico | 20 |
| 3.5.1 Diseño factorial..... | 20 |
| 3.6 Materiales, Reactivos, Equipos y Métodos | 21 |
| 3.6.1 Materiales..... | 21 |
| 3.6.2 Reactivos..... | 21 |
| 3.6.3 Equipos..... | 22 |
| 3.6.4 Métodos | 22 |
| 3.6.5 Método del sulfuro sódico..... | 22 |
| 3.6.6 Método de Shindai..... | 23 |
| 4 Metodología | 24 |
| 4.1 Proceso del estudio | 26 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 4.1.1 | Recolección de la materia prima | 26 |
| 4.2 | Procedimiento propuesto para la extracción de queratina alfa soluble..... | 26 |
| 4.2.1 | Tratamiento de la materia prima | 26 |
| 4.3 | Procesos químicos de la materia..... | 27 |
| 4.3.1 | Hidrolisis alcalina | 27 |
| 4.3.2 | Oxidación | 27 |
| 4.3.3 | Filtración a vacío..... | 27 |
| 4.4 | Verificación del producto obtenido | 28 |
| 4.4.1 | Pruebas físicas para el producto obtenido | 28 |
| 4.4.2 | Pruebas químicas para el producto obtenido..... | 29 |
| 4.4.2.1 | Verificación del pH-metro. | 29 |
| 4.4.3 | Pruebas organolépticas a la muestra..... | 29 |
| 5 | Resultados y discusión | 30 |
| 6 | Conclusión | 41 |
| 7 | Recomendaciones..... | 42 |
| 8 | Bibliografía..... | 43 |
| 9 | Anexos | 47 |
| 9.1 | Reactivos | 47 |
| 9.2 | Preparación de soluciones..... | 48 |
| 9.3 | Imágenes del procedimiento de extracción..... | 49 |
| 9.3.1 | Etapas de extracción..... | 49 |
| 9.3.2 | Equipos..... | 52 |

Resumen

La queratina es una proteína natural que la encontramos en el cabello y uñas de seres humanos, así como también en pelo, plumas, cuernos y pezuñas animales, que son fuentes de materia prima de esta proteína ya sea alfa o beta, y constituye una forma de aprovechamientos de estos para el proceso de extracción.

El objeto principal de esta investigación es adaptar un procedimiento adecuado, económico y viable para la obtención de alfa queratina a partir de pezuñas bovinas, y ajustado a las condiciones del laboratorio. El procedimiento propuesto consta de las etapas de limpieza, lavado, cortado, triturado, desengrasado, hidrolisis, oxidación y filtración.

Inicialmente, se realizaron pruebas de ensayos, siguiendo fielmente los procedimientos indicados en los métodos de referencia, pero no se obtuvo resultado del producto esperado, a causa de la evaporación del producto en la etapa de hidrolisis, y la precipitación de la proteína en la etapa de oxidación. Por ello, se probaron otras cantidades de muestra, extractante y oxidante en el procedimiento de extracción propuesto.

Debido a estos cambios se implementó un diseño factorial de 3 variables (gramos muestra, concentración de extractante, volumen de oxidante) con un total de 8 experimentos, para determinar que factor influía en el proceso de extracción, y en los volúmenes resultantes del producto obtenido. A los 8 experimentos se les realizó pruebas físicas, químicas, y organolépticas, obteniendo resultados similares entre las repeticiones y los valores de referencia.

Contextualización

Las queratinas son abundantemente disponibles como subproductos, principalmente de los mataderos y plantas de aves de corral en forma de residuos de la piel, pelo, cuernos, pezuñas, plumas, garras, etc., que se han perdido sin utilidad adecuada. Durante el siglo pasado, la investigación se ha centrado en la extracción y purificación de las queratinas (de diferentes fuentes) para ser utilizadas en una amplia variedad de aplicaciones. Estudio “Extracción de Queratina en pezuñas Bovina” universidad ANNA, Chennai (sur de la india) (Yamauchi, 1996)

En España se realizó un estudio de extracción de queratina en lana de oveja. La Lana se considera un residuo agroindustrial para los ganaderos debido a su difícil tratamiento y valorización. El desarrollo de productos derivados de esta lana en diversas aplicaciones industriales supondría una fuente de ingresos adicional para esta actividad económica. (Gómez, M. 2011).

La mayor parte de las investigaciones se centra en el proceso de obtención de queratina, a partir de las plumas de aves de corral, como alternativa de aprovechamiento en la industria cosmética. En Quito se realizó una “Obtención de queratina de plumas de gallina”, por la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador, el estudio fue realizado por Rodríguez Suly en el 2009, aplicó el método de sulfuro de sodio en sus condiciones ambientales. De 10g de plumas (solamente las fibrillas) se obtuvo 2.729 g de queratina, en forma de polvo blanco con un punto de fusión de 196-200°C, y resultado positivo al análisis elemental de azufre. (Rodríguez, 2009)

De la misma manera, la Universidad Central Del Ecuador Facultad de Ciencias Químicas, Carrera de Química Farmacéutica, presentó otro estudio a partir de la materia prima que son las plumas de aves de corrales donde se muestra diferentes métodos para la obtención de la Queratina líquida para uso cosmético. (Salazar, 2013).

En centro América se han realizado estudios de dos métodos adecuados para la producción de queratina hidrosoluble a partir de plumas de pollo los cuales son el método de sulfuro de sodio y borohidruro de sodio. Se establecieron parámetros óptimos (tiempo de reacción, volumen y concentración), así como también la temperatura exacta para

obtener un producto con características similares a las de una queratina cosmética, adquirida en el comercio. (Chávez; Tenorio, 2014)

1. Introducción

Nicaragua es un país con un enfoque en la ganadería, desde el punto de vista económico, ésta industria genera grandes ingresos; sin embargo, también produce un volumen considerable de residuos o desechos entre ellos gran cantidad de pezuñas que, al no ser aprovechados, acrecientan la problemática ambiental. Estos residuos (principalmente pezuñas, cuernos, pelo) contienen un alto porcentaje de queratina, lo que ha llevado a estimular una investigación centrada en el estudio de los posibles usos de estos desechos como materia prima para la obtención de queratina.

La queratina es una proteína que ha ido tomando popularidad en los últimos tiempos. Se la conoce más ampliamente en la industria cosmética. Se le atribuyen varias propiedades al ser aplicada sobre el cabello, como brillo, elasticidad y resistencia. También tiene aplicaciones en otras industrias como la agrícola, médica y textil. (Chávez; Tenorio, 2014) Por ejemplo, en Ecuador mensualmente se desechan 72 toneladas de plumas de pollo y se importa grandes cantidades de productos cosméticos como cremas, gel, shampu, loción, etc. para el cabello que contienen queratina. (Claudio, 2009)

La extracción de queratina en pezuñas bovinas ha sido poco estudiada por la complejidad de tratamiento de solamente se encontraron referencias de estudios, en el continente asiático y el sur de América. Se han encontrado investigaciones de métodos de obtención de queratina a partir de residuos agroindustriales como lo son las plumas de pollo, pero no existen reportes a nivel de centro América sobre el aprovechamiento de residuos de pezuñas bovinas, para obtener esta misma proteína.

De acuerdo con el reglamento CE 1774/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, los residuos de queratina se han clasificado como material de la categoría 3, que indica que no se destina al consumo humano; sin embargo, el mismo no transmite enfermedades a

los seres humanos y animales. Durante el siglo pasado, la investigación se ha centrado en la extracción y purificación de las queratinas (de diferentes fuentes) para utilizarla en una amplia variedad de aplicaciones. Estudio en pezuña bovina. (Yamauchi., 1996)

Hay una cantidad significativa de investigaciones que se han llevado a cabo en varias fuentes de queratina, hay informes escasos disponibles en la extracción, caracterización y utilización de la queratina de los cascos de la especie bovina, que es una importante fuente de queratina en comparación con otras fuentes de queratina.

A su vez se desconoce la influencia de las variables de condiciones del proceso de obtención de la queratina en sus parámetros de calidad, ya que los métodos encontrados especifican las condiciones necesarias para su extracción y esto no permite saber si la calidad de la queratina aplicada en el área de la cosmética es de buen resultado. (Yamauchi., 1996)

El objetivo principal de esta investigación es establecer un método adecuado de producción de queratina hidrosoluble, a partir de pezuñas bovinas, y condiciones necesarias para la obtención del producto.

En este trabajo se recolectó la muestra de residuos de pezuña sin distinción de edad del ganado bovino. Para la caracterización del hidrolizado obtenido, se evaluaron algunas propiedades físicas y químicas como: densidad, punto de fusión, punto de ebullición, color, olor y pH.

1.1 Planteamiento de problema

Nicaragua ocupa un lugar importante a nivel agroindustrial (Chávez; Tenorio, 2014) en los cuales, se generan desechos que aún no son aprovechados, como es el caso de las pezuñas que son arrojadas a los basureros sin ningún tratamiento previo, por lo cual se generan residuos, estos son biodegradables y sufren un proceso de descomposición que dura años antes de integrarse nuevamente al ambiente, durante este tiempo de descomposición se presentan diferentes problemas como la emanación de malos olores, contaminación de fuentes de agua y la proliferación de plagas (moscas, gusanos, etc.) causando amenazas al medio ambiente. Una forma de aprovechar este recurso que ha sido poco estudiado, es utilizarlo como materia prima para la obtención de queratina. Documentos confirman que el tiempo de degradación de esta materia es aproximadamente de 15 a 20 años. (Salazar, 2013).

Existe un método establecido para la extracción de queratina en pezuña bovina (Yamauchi,1996) en el que se utiliza reactivos y equipos que no están al alcance para llevar a cabo este proceso, así mismo se considera que algunos de los reactivos del método de Shindai son un poco agresivo para el uso o aplicación, por lo tanto, se pretende realizar una modificación a los métodos sulfuro sódico y de Shindai adaptando un nuevo procedimiento a las condiciones del laboratorio con el fin de obtener un método, favorable para fines cosméticos.

1.2 Justificación

La finalidad del estudio es la implementación de un método para la extracción de queratina alfa soluble empleando como materia prima pezuñas bovinas procedente del rastro municipal-León mediante la combinación de los métodos de Shindai y sulfuro de sodio adaptado a nuestras condiciones de trabajo (reactivos y equipos disponibles).

En los últimos tiempos a nivel mundial la queratina alfa-soluble se ha convertido en un aditivo principal en productos para el tratamiento de cabello, por lo que constituye una empresa importante en la industria cosmética y como aprovechamiento paliativo de residuos generados (pezuñas bovinas).

Existen dos tipos de queratina, alfa y beta: el alfa es soluble y se emplea para fines cosméticos y la beta es insoluble y es utilizada en la industria textil y la industria médica. Ambas se diferencian por su proceso de extracción, la queratina beta requiere de un procedimiento más (liofilización) para su obtención.

Por lo que se propone un procedimiento de bajo costo y que se adapta a nuestras condiciones de trabajo para llevar a cabo el proceso de extracción de queratina alfa-soluble, y para comprobar la presencia de la proteína se realizan algunas pruebas físicas, químicas y organolépticas.

2 Objetivos

2.1 Objetivo general

Extraer queratina alfa-soluble mediante la combinación de los métodos Shindai y Sulfuro sódico en pezuñas bovinas para uso cosmético.

2.2 Objetivos específicos

- Elaborar un procedimiento a partir de los métodos Shindai y Sulfuro sódico para la extracción de queratina alfa soluble adaptado a las condiciones de trabajo.
- Ajustar las variables (gramos de muestra, concentración del extractante, volumen de oxidante) del procedimiento propuesto para la extracción de queratina alfa soluble en pezuñas bovinas.
- Identificar la presencia de la proteína mediante pruebas de densidad, punto de fusión, punto de ebullición, pH, y pruebas organolépticas (color, olor, apariencia y textura).

3 Marco teórico

3.1 Materia prima

3.1.1 Pezuñas bovinas

Una pezuña es una uña muy desarrollada, compuesta por queratina, que cubre los dedos de las patas en los animales ungulados. Los animales que tienen pezuñas caminan apoyando su peso en éstas y se denominan por ello digitígrados, Un digitígrado es un animal que permanece o camina apoyado solamente en los dedos de sus patas, sin apoyar la articulación del talón.

El principal componente de piel, cabello, uñas, pezuñas y cuernos es la queratina, esta proteína es extremadamente fuerte, los aminoácidos que la conforman tienen características únicas y son los responsables de que la queratina sea suave y flexible como la presente en la piel o dura y resistente como en el caso de los cascos. La figura 1 muestra la superficie del casco bovino (Gloobe, 1989: pp.43-44)

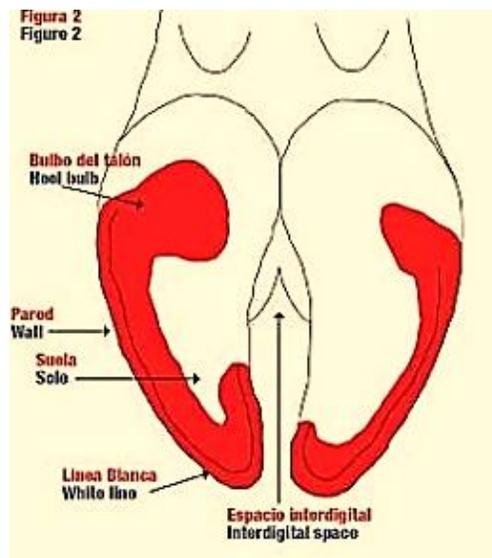


Figura.1. Superficie del casco bovino (Gloobe, 1989)

3.2 Las proteínas

Son biopolímeros, formados por gran número de unidades estructurales repetitivas, debido a su gran tamaño, cuando estas moléculas se dispersan en un disolvente adecuado, forman siempre dispersiones coloidales, con características que las diferencian de las disoluciones de moléculas más pequeñas. (García, 2010)

3.2.1 Características de las proteínas

Las proteínas son largas cadenas de aminoácidos unidas por enlaces peptídicos entre el grupo carboxilo (-COOH) y el grupo amino (-NH₂) de residuos de aminoácido adyacentes. En la figura 2 se presenta la reacción entre aminoácidos para la formación de enlaces peptídicos.

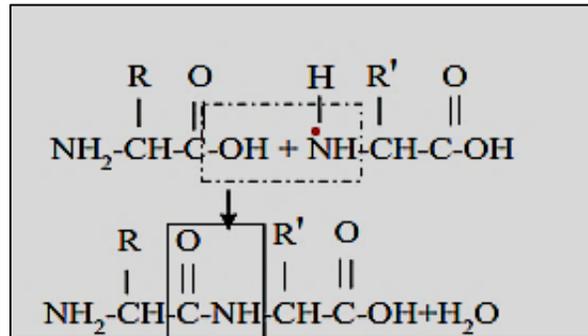


Figura.2. Reacción entre aminoácidos para formar el enlace peptídico (García, 2010)

Por hidrólisis, las moléculas de proteína se dividen en numerosos compuestos relativamente simples, de masa molecular pequeña, que son las unidades fundamentales constituyentes de la macromolécula, estas unidades son los aminoácidos, de los cuales existen veinte especies diferentes y que se unen entre sí mediante enlaces peptídicos. Cientos y miles de estos aminoácidos pueden participar en la formación de la gran molécula polimérica de una proteína. (García, 2010).

3.2.2 Estructura de las proteínas.

La organización de una proteína viene definida por cuatro niveles estructurales denominados: estructura primaria, estructura secundaria, estructura terciaria y estructura cuaternaria. Cada una de estas estructuras informa de la disposición de la anterior en el espacio. (García, 2010)

- a) Estructura primaria: la estructura primaria es la secuencia de aminoácidos de la proteína. Nos indica qué aminoácidos componen la cadena polipeptídica y el orden en que dichos aminoácidos se encuentran. La función de una proteína depende de su secuencia y de la forma que ésta adopte, tal como se muestra en la siguiente figura.

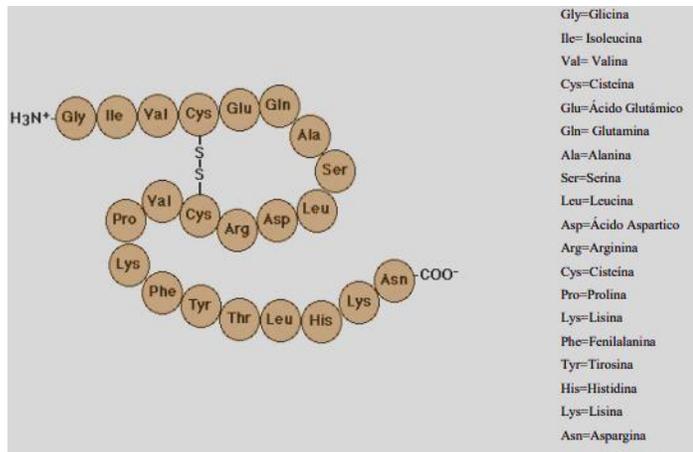


Figura.3. Estructura primaria de las proteínas. (Benítez, 2008)

b) Estructura secundaria: la estructura secundaria es la disposición de la secuencia de aminoácidos en el espacio. Los aminoácidos, a medida que van siendo enlazados durante la síntesis de proteínas y gracias a la capacidad de giro de sus enlaces, adquieren una disposición espacial estable.

Existen dos tipos de estructura secundaria:

- Estructura alfa-hélice. - ésta estructura se forma al enrollarse helicoidalmente sobre sí misma. Se debe a la formación de enlaces de hidrógeno entre el -C=O de un aminoácido y el -NH- del cuarto aminoácido que le sigue. La figura 4 muestra la estructura alfa-hélice de las proteínas con estructuras secundarias.

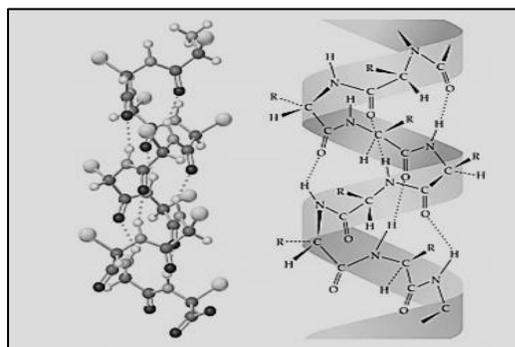


Figura.4. Estructura secundaria (alfa- helicoidal) de las proteínas. (Benítez, 2008)

- Estructura beta: en esta disposición los aminoácidos no forman una hélice sino una cadena en forma de zigzag, denominada disposición en lámina plegada como se observa en la figura 5 siguiente.

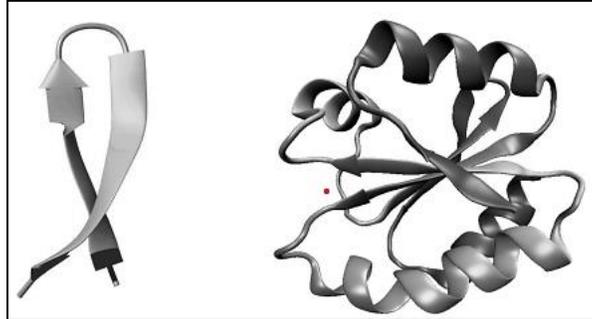


Figura.5. Giro beta y estructura secundaria beta de las proteínas. (Benítez, 2008)

El giro beta permite un cambio de dirección de la cadena peptídica, necesario para que adopte una estructura más compacta y las hebras beta están representadas como flechas, conectadas a través de dobleces y giros beta.

- c) Estructura terciaria: ésta corresponde a la disposición de la estructura secundaria de un polipéptido, al plegarse sobre sí misma originando una conformación globular, la que facilita la solubilidad en agua y así realizar funciones de transporte, enzimáticas, hormonales, etc.

Esta conformación globular se mantiene estable gracias a la existencia de enlaces entre los radicales R de los aminoácidos.

Los varios tipos de enlaces son:

- Unión disulfuro entre los radicales de aminoácidos que tienen azufre.
- Puentes de hidrógeno.
- Unión iónica.
- Interacciones hidrófobas.

La figura 6 presenta las conformaciones globulares con los diferentes tipos de enlaces.

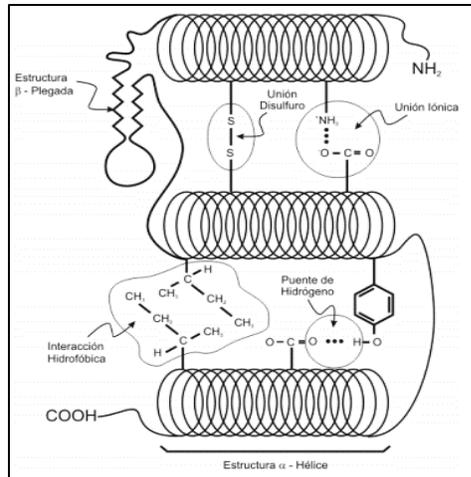


Figura. 6: Estructura terciaria de las conformaciones globulares. (Genoma, 2010)

d) Estructura cuaternaria: Esta corresponde al complejo proteico, formado por enlaces débiles (no covalentes) de varias cadenas polipeptídicas con estructura terciaria (Figura 7). Cada una de las cadenas polipeptídicas recibe el nombre de protómero. El número de protómeros varía desde dos, (como en la hexoquinasa); cuatro (como en la hemoglobina), o muchos, (como la cápsida del virus de la poliomielitis, que tiene sesenta unidades proteicas).

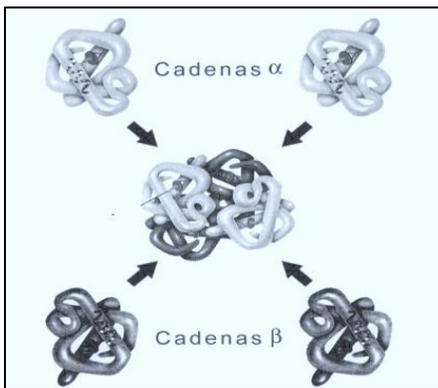


Figura.7. Estructura cuaternaria de las proteínas. (Genoma, 2010)

La figura anterior corresponde a la molécula de hemoglobina. Formada por dos cadenas de α-hemoglobina y dos cadenas de β-hemoglobina. Cada Cadena transporta una molécula de oxígeno es la que conforma la estructura cuaternaria. (Genoma sur, 2010)

3.3 Queratina

Es una proteína que se presenta en forma de microfibrillas, como si fuesen una maroma o cuerda. Las proteínas siempre están formadas por cadenas de aminoácidos que se enlazan entre sí formando fibrillas. Está muy extendida en la naturaleza: además de encontrarse en la piel, cabello y uñas en humanos, también se encuentra en la lana, las plumas, pelo, pezuñas, cuernos, etc., de los animales.

La queratina está compuesta básicamente por un aminoácido de alto contenido de azufre (cistina). La queratina puede ser de dos clases: dura y blanda. Las queratinas duras contienen entre un 15 o un 18% de azufre, mientras que las blandas sólo tienen entre un 2 y un 4%.

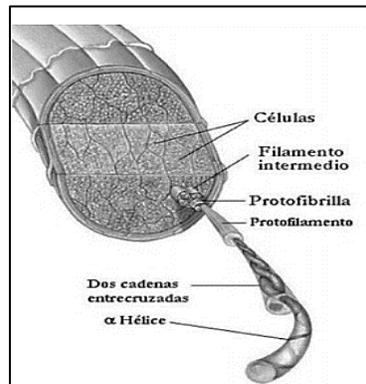


Figura.8. Estructura de la fibra de queratina. (Dvorkin, 2010)

La figura 8 presenta la estructura de una fibra de queratina la cual está compuesta por una serie de aminoácidos, entre los más abundantes esta: la Glicina 21,5% (Gli), Fenilalanina 3,9% (Fen), Alanina 11% (Ala), Ácido aspártico 9,3% (Asp), Cisteína 12,2% (CiSH), Lisina 7,3% (Lis), Prolina 2,3% (Pro), Valina 4,2% (Val), Leucina 3,2% (Leu), Isoleucina 1,2% (Ile) Treonina 4,8%(Tre), Otras.19, 1%. En la siguiente figura se observa la estructura completa de la queratina y sus conformaciones amídicos

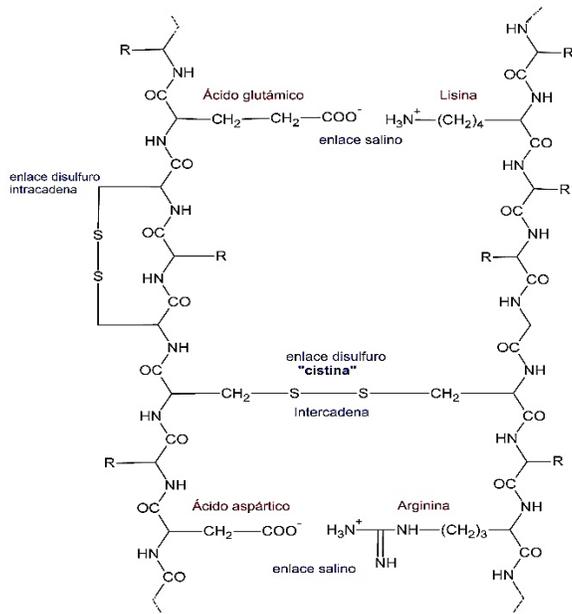


Figura.9: Estructura general de la queratina

3.3.1 Estructura de la queratina.

La queratina posee tres clases de estructuras: estructura primaria, estructura secundaria, y estructura terciaria.

- Estructura primaria: ésta es fundamental para conservar la forma tridimensional de la proteína, cualquier modificación en la secuencia de aminoácidos podría ocasionar un cambio en la estructura tridimensional y afectará la función biológica. (Chamizo J.1994). En la figura 10 se muestra la secuencia de enlaces entre los aminoácidos que corresponden a la estructura primaria de la queratina.

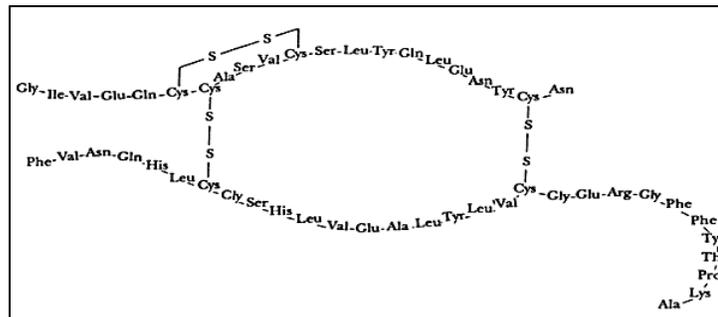


Figura.10. Estructura primaria de la queratina. (Benítez, 2008)

b) Estructura secundaria: A medida que la cadena de aminoácidos de queratina 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 como se muestra en la figura siguiente.

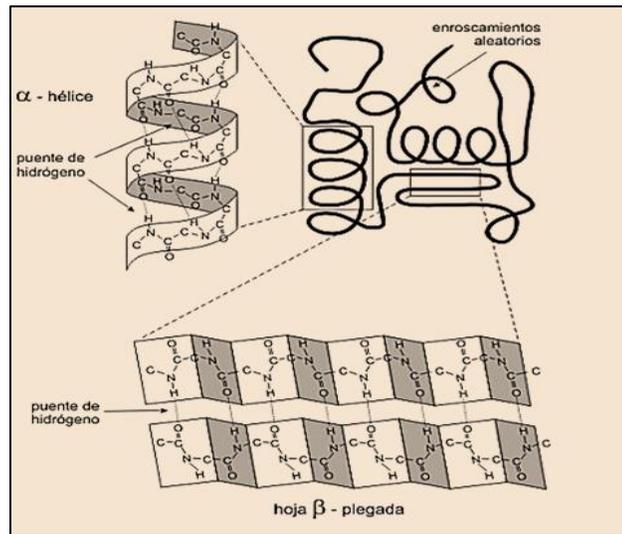


Figura.11. Estructura secundaria, en α -hélice y en hoja β -plegada, de la queratina. (Benítez, 2008)

c) Estructura terciaria: Debido a la interacción de los grupos R de los aminoácidos, la cadena polipeptídica se pliega determinando una intrincada estructura tridimensional como se observa en la figura 12.

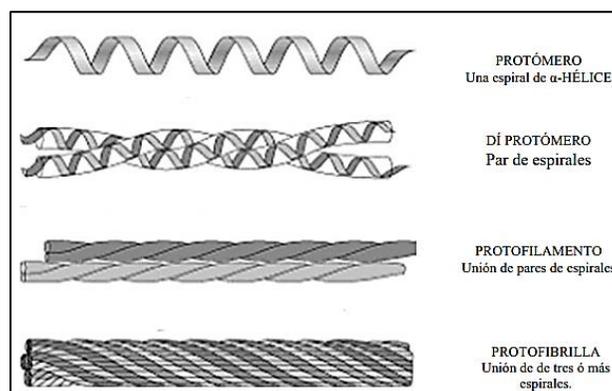


Figura.12. Estructura terciaria de la queratina. (Benítez, 2008)

Los protómeros de queratina se unen entre sí para formar dímeros. El dímero es el primer precursor de la gran molécula de la queratina en el que entran en juego varias proteínas. La unión no tiene lugar de cualquier manera, sino de una forma muy concreta: una subunidad ácida se unirá con una subunidad básica. De esta forma, la macromolécula acabará teniendo la misma proporción de subunidades básicas que de subunidades ácidas.

3.3.2 Reacciones químicas de la queratina:

La queratina presenta propiedades exclusivas como proteína debido a la presencia de enlaces tales como:

- Enlaces amídicos: unen un aminoácido con otro para formar la cadena principal, son muy sólidos y solo se rompen con soluciones acuosas concentradas de ácidos y bases fuertes.
- Puentes salinos: se forman entre los grupos de ácidos y básicos de las cadenas laterales. Cuando estos grupos sobrantes no forman enlace amídico, están cerca uno del otro, se origina una atracción entre sus cargas o atracciones electromagnéticas.
- Enlaces disulfuro: es la unión que existe entre los dos átomos de azufre de la molécula de cistina. Esta unión es fuerte y en la molécula de alfa-queratina suele existir un puente de este tipo cada cuatro vueltas de la espiral.
- Puentes de hidrógeno: se originan por la atracción de átomos con polaridad negativa al hidrógeno con polaridad positiva. Por estos puentes las cadenas no son rectilíneas sino helicoides, girando sobre sí misma como una cinta enrollada. Tal como es el caso de la alfa-queratina, cuyas uniones son débiles en relación a la unión de los aminoácidos y se rompen con facilidad, cuando se mojan con agua, o por estiramiento, o la beta-queratina que no es estable, por las cadenas que toman así una forma aplanada o estirada, y tiende a recuperar la posición alfa-queratina. (Wilkins, Moore, & Rodriguez, 1990).

3.3.3 Reductores y oxidantes de la queratina

3.3.3.1 Reductor

Dentro de las sustancias que reaccionan con la queratina se encuentra el Sulfuro de sodio (Na_2S) que es una sustancia cristalina incolora con buena solubilidad en el agua y mala solubilidad en la mayoría de los disolventes orgánicos, con excepción de la glicerina.

Es un agente queratolítico efectivo para el reblandecimiento de proteínas, tales como la queratina. Cuando se disuelve en agua da soluciones fuertemente alcalinas (NaOH).

Como el azufre, es menos electronegativo que el oxígeno y sus electrones externos están más esparcidos: los átomos de azufre forman enlaces de hidrógeno más débiles que con el oxígeno. (Favela, 2012)

3.3.3.2 Oxidante

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2), es otra de las sustancias involucradas en el proceso de extracción de queratina, la que a temperatura ambiente es un líquido incoloro con sabor amargo. Pequeñas cantidades de peróxido de hidrógeno gaseoso se encuentran naturalmente en el aire. El peróxido de hidrógeno es inestable y se descompone lentamente en oxígeno y agua con liberación de calor. Su velocidad de descomposición puede aumentar mucho en presencia de ciertos catalizadores. Aunque no es inflamable, es un agente oxidante potente que puede causar combustión espontánea cuando entra en contacto con materia orgánica o algunos metales, como el cobre, la plata o el bronce. (Escobados, Cisneros, 2007)

Como el H_2O_2 , es un líquido altamente polar, fuertemente enlazado con el hidrógeno, tal como el agua, es un líquido ligeramente más viscoso que éste. Totalmente miscible en agua, e inmiscible con la mayoría de disolventes orgánicos.

El peróxido de hidrogeno es empleado en procesos de oxidación, ya que provee fácilmente átomos de oxígeno. Con moléculas que tienen enlaces sulfuros, los convierte a azufre a pH ácido, mientras que a pH alcalino (superiores a 8) forma sulfato, es decir que, es un fuerte oxidante en medio ácido y, en menor medida en medio básico.

El poder oxidante del peróxido de hidrógeno, es mayor conforme aumente su concentración, y de esta manera la tendencia del pH final de la solución es a disminuir.

3.3.4 Usos de la queratina

3.3.4.1 En cosmetología

La queratina es parte de muchos tratamientos cosméticos capilares, protege el interior del cabello, influye en el color y en el brillo, que le afectan los factores mecánicos, químicos o ambientales. Estos modifican la estructura del cabello convirtiéndolo en frágil quebradizo y poroso, la queratina puede evitar el deterioro del cabello por la continua exposición a estos factores. (Wilkins, Moore, & Rodriguez, 1990).

3.3.4.2 En la industria textil

La queratina, se usa como material de refuerzo en la fabricación de polímeros industriales, tales como: los polietilenos y los polipropilenos, en la producción de pasta de papel o cartón y la fabricación de biomateriales o materiales biomédicos, entre otros.

3.3.4.3 En la industria alimenticia.

La queratina, que contiene las plumas, es un recurso alimenticio potencial. Luego de un proceso hidrolítico, de estos residuos, ellos se transformarán en una proteína digestible, que es útil como concentrado proteico para rumiantes, ya que optimiza el índice de crecimiento del ganado de engorde y también suple las necesidades de proteína en ganado lechero. Como se extrae de una fuente natural, no contiene toxinas e inhibidores del crecimiento, pueden ser usadas en dietas balanceadas sin limitaciones nutricionales.

3.3.4.4 En la industria agrícola

La queratina, presente en las plumas es un recurso adecuado para la elaboración del Compost (proceso de degradación microbiológico aerobio de materiales orgánicos realizado en condiciones controladas, en el que debido a la actividad microbiana se obtiene un abono orgánico) que en conjunto con una mezcla de materiales fecales, orina, tierra y restos vegetales permiten el proceso de compostaje, permitiendo que la queratina lentamente se degrade y se convierta en una sustancia de fácil biodegradación, contribuyendo al desarrollo de los microorganismos que enriquecerán el suelo con nitrógeno y fósforo. (Carlosama, 2010).

3.3.5 Pruebas físicas de la queratina alfa-soluble

3.3.5.1 Densidad

La densidad es una propiedad básica de cualquier líquido, y se define como su masa por unidad de volumen. Las unidades más comunes de la densidad son g/ml y kg/m³. En el caso concreto del agua, su densidad es 1g/ml o bien 1000 kg/m³. (Huerta, 2013). Viene dada por la siguiente ecuación:

$$\rho_d = \frac{m_{p+d} - m_p}{V_p}$$

Ecuación.1.Fórmula para calcular la densidad

3.3.5.2 Punto de fusión.

La fusión es el proceso por el cual un sólido pasa a líquido por la acción del calor; el punto de fusión de una sustancia sólida a una presión dada se define como la temperatura a la cual ocurre la transición de las fases. Sin embargo, este proceso puede ir acompañado por descomposición del producto. El punto de fusión suele ser la primera propiedad física que se determina para caracterizar una sustancia sólida. (Pérez, 2016)

3.3.5.3 Punto de ebullición

El punto de ebullición es la temperatura a la cual se genera un cambio de estado de líquido a vapor (Perez, 2016)

3.3.6 Pruebas químicas de la queratina alfa-soluble

3.3.6.1 pH

El pH es una medida de acidez o alcalinidad que indica la cantidad de iones de hidrógeno presentes en una solución o sustancia. (Perez, 2016).

3.3.7 Pruebas organolépticas a la muestra.

Un análisis organoléptico es una valoración cualitativa que se realiza sobre una muestra, basada exclusivamente en la valoración de los sentidos (vista, gusto, olfato, etc.)

3.3.7.1 Color y olor

El color y olor debe ser característico de la materia prima de la cual fue extraída.

3.3.7.2 Apariencia y textura

Debe ser un líquido fluido viscoso, poco denso.

3.4 Valores de referencia de Queratina Alfa soluble

Tabla. 1: Valores de referencia (Rodríguez, 2009)

| Magnitudes | Valores teóricos |
|----------------------|---------------------------------------|
| Densidad | 1.15 - 1.20 g/mL |
| Punto de fusión | 190 - 200 °C |
| Punto de ebullición | 100 - 146 °C |
| pH | 4.8 - 6.8 |
| Olor y color | Característico de la materia extraída |
| Apariencia y textura | Líquido fluido, viscoso |

3.5 Análisis estadístico

3.5.1 Diseño factorial

Es una técnica estadística de reducción de datos, usada para explicar las correlaciones entre las variables observadas en términos de un número menor de variables no observadas llamadas factores. Las variables observadas se modelan como combinaciones lineales de factores, más expresiones de error. (Chuecon, Carles, 2008)

$$2^n$$

Ecuación 2. Fórmula para determinar el número de factores.

3.6 Materiales, Reactivos, Equipos y Métodos

3.6.1 Materiales

Tabla. 2: Materiales para el proceso de extracción.

| NOMBRE | MARCA | CLASE |
|-----------------------------|--------|-------|
| Balones fondo redondo 250mL | pirex | A |
| Beaker 100, 250mL | pirex | A |
| Espátula | ----- | ----- |
| Probeta 10, 100mL | pirex | A |
| Gotero | ----- | ----- |
| Magneto | ----- | ----- |
| Varilla de vidrio | ----- | ----- |
| Kitazato | pirex | A |
| Embudo Büchner | coors | A |
| Picnómetro. 10mL | pirex | A |
| Papel filtro | pliego | |
| Pizeta | ----- | ----- |
| Capilares | ----- | ----- |

3.6.2 Reactivos

Tabla. 3: Reactivos para el proceso de extracción

| NOMBRE | MARCA | No. CAS |
|--------------------------|--------------------------|--------------|
| Sulfuro Sódico | T3Q | 1313-84-4 |
| Peróxido de Hidrogeno 9% | Fisher chemical | 7732-18-5 |
| Ácido Sulfúrico 20% | Fisher chemical | 7664-93-9 |
| Hidróxido de Sodio 0.5 M | Emsure | 011-002-00-6 |
| Hexano | EM | 110-54-3 |
| Diclorometano | Fisher chemical | 67-66-3 |
| Buffer 4,7,10 | Thermo Fisher scientific | 258590000 |

3.6.3 Equipos

Tabla. 4: Equipos para el proceso de extracción

| NOMBRE | MARCA | MODELO |
|------------------------|--|---------------|
| Molino semi industrial | Wiley Mill | 1886p-2 |
| Aparato Soxhlet | Refrigerante: Savant Manta calefactora: electromantle | 145 --- |
| Bomba de vacío | Welch | modelo 8907A |
| pH-metro | Orions star | 123 |
| Fusiómetro | barnstead electrothermal | IA9000 |
| Agitador-Plancha | Isotemp Fisher Scientific. | 233556 |
| Balanza | Sartorius | Practum213-1S |

3.6.4 Métodos

Existen varios métodos para extraer queratina, dentro de los cuales se pueden mencionar:

- Sulfuro de sodio
- Shindai
- Etóxido de sodio
- Borohidruro de sodio
- Métodos con microorganismos

De todos ellos, los métodos que más se ajustan a las condiciones de trabajo son: Sulfuro sódico y Shindai.

3.6.5 Método del sulfuro sódico

Este método se creó para la extracción de queratina en plumas de gallina. El estudio se realizó en los laboratorios de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador.

3.6.5.1 Procedimiento

A un frasco de polietileno seco (de boca ancha, con tapa de rosca y de un litro de capacidad) se adiciona 5 g de plumas y 50mL de solución acuosa de 3g de sulfuro de sodio. El frasco con la mezcla anterior se tapa y se sujeta sobre una plataforma móvil, donde la mezcla se agita por un 24h a temperatura ambiente. La suspensión obtenida se filtra (con papel cualitativo), el filtrado se recoge en otro frasco de vidrio (de boca ancha con tapa y de 500mL de capacidad), luego se adiciona 2.5mL de peróxido de hidrógeno de 30V. El recipiente se tapa y se agita en la plataforma móvil por 50 minutos, a

temperatura ambiente. Luego la mezcla anterior se acidifica hasta pH 4.8, adicionando ácido sulfúrico al 20% dejar en reposo 24h. La suspensión formada se decanta por 24 horas y se filtra con papel cualitativo. El sólido se lava con 50mL de agua destilada, la mezcla del filtrado y el agua del lavado se neutraliza con hidróxido de sodio diluido (hasta pH 7) y se deja en reposo por 48 horas. Luego se filtra la suspensión, el sólido se lava con 50mL de agua destilada, el filtrado se agita por 2 horas y se decanta por 1 día. Hecho esto, se filtra la suspensión (en papel cualitativo) y el filtrado se afora a 200mL. Esta es la solución acuosa de queratina obtenida. (Florido, 2010)

3.6.6 Método de Shindai

Este método se emplea para extraer queratina alfa y beta en pezuñas bovinas. Se desarrolló en la Universidad ANNA, Chennai, ciudad al sur de la india.

3.6.6.1 Procedimiento

La primera etapa de extracción es el desengrasado es decir, la eliminación de las grasas de la materia prima mediante el aparato Soxhlet; usado para llevar a cabo el desgrasado/deslipidización de la muestra de pezuña pulverizada durante dos días. Mezcla de hexano y diclorometano (1:1, v/v) se utiliza para reflujo. 10g de materia prima desgrasada se mezcla con 7M urea, 6g de SDS (dodecilsulfato sodico) y 15 ml de 2-mercaptoetanol en un matraz de 1000 ml de fondo redondo y se mantuvo en un agitador orbital a 60 C durante 12 h para extraer la queratina a pH 7 (Yamauchi et al 1996). Después, la solución resultante se centrifuga durante 15 min a 6000 rpm y el sobrenadante se dializa frente a agua desgasificada durante 5-6 días. Una cantidad de queratina extraída se mantuvo en un congelador a -80 C durante 5 h y se liofilizó para convertirlo en polvo. En lo sucesivo, la queratina dializada, es decir el que antes de la liofilización, se menciona como la queratina líquido (alfa queratina) y el liofilizado se mencionará como la queratina en polvo (beta queratina).

4 Metodología

El estudio realizado es de tipo experimental-cuantitativo. Primeramente, se recolecto la materia prima (pezuñas bovinas), y luego se llevó a cabo los procesos para el acondicionamiento de esta materia (lavado, secado, cortado, triturado, desengrasado, hidrolisis, oxidación, filtración). Posteriormente se efectuaron pruebas de verificaciones físicas, químicas y organolépticas para la identificación del producto obtenido.

El proceso de extracción de alfa queratina a partir de pezuñas bovina se realizó en el laboratorio de energía renovable de la facultad de ciencias y tecnología (UNAN-León).

Se modificaron los métodos Shindai y Sulfuro Sódico para obtener el nuevo procedimiento de extracción de queratina alfa soluble, ya que ambos métodos son empleados para extraer queratina alfa soluble y beta queratina. La queratina alfa es soluble en medio acuoso y la beta queratina es completamente insoluble.

Se realizó un diseño factorial con tres variables (gramos de muestra, concentración de extractante (Na_2S), volumen de Oxidante (H_2O_2)) en base a la ecuación N°2, ($2^n = 2^3 = 8$) con un total de 8 experimentos para indicar qué factores influían en este proceso propuesto de extracción de queratina alfa soluble.

A continuación en la figura 13 se muestra los métodos de extracción de queratina de referencia que se modificaron y el nuevo método propuesto de extracción.

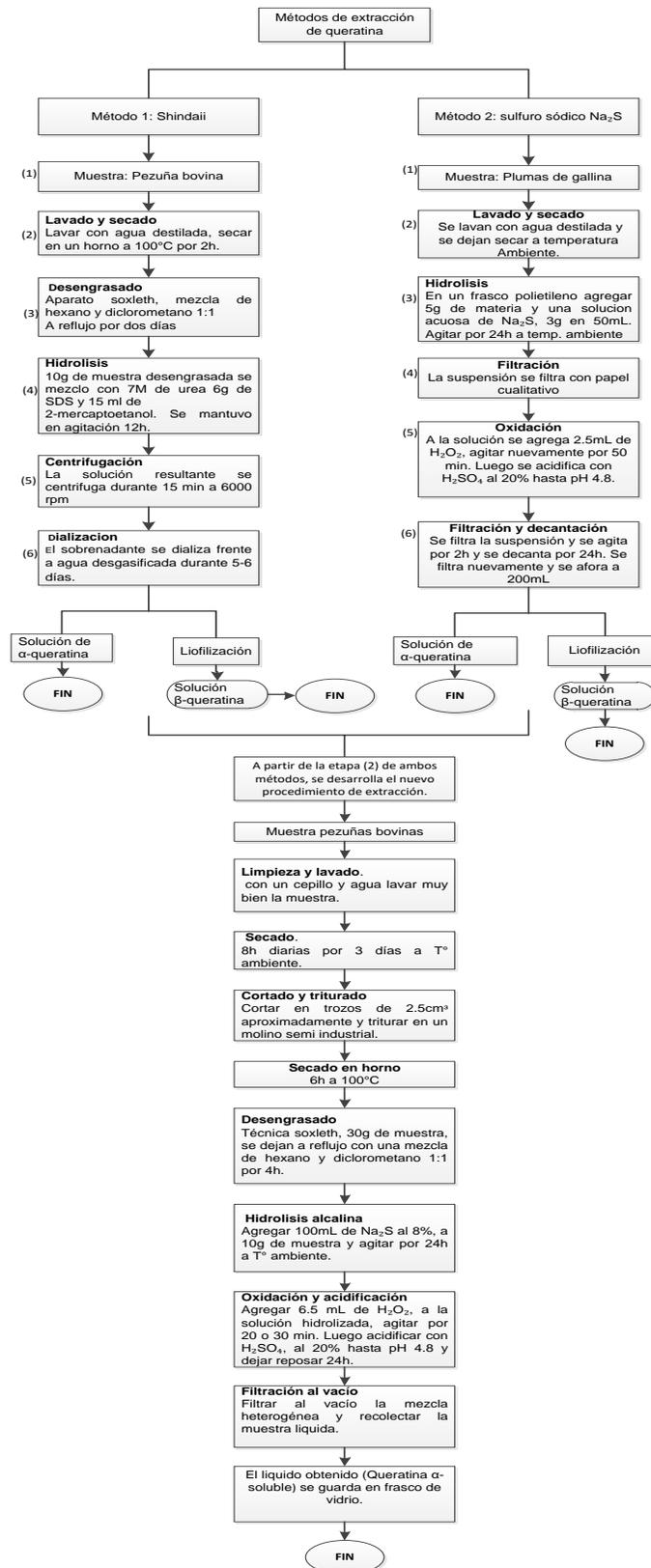
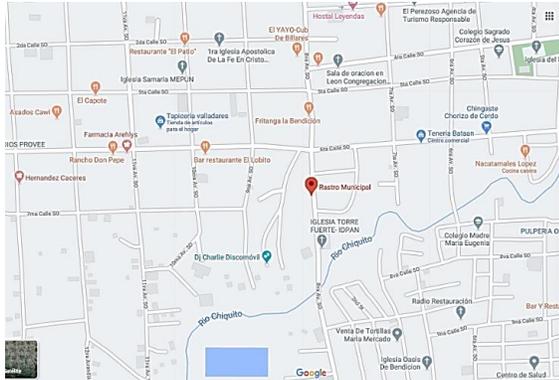


Figura 13. Flujograma de los métodos modificados y nuevo método de extracción.

4.1 Proceso del estudio

4.1.1 Recolección de la materia prima

La materia prima (pezúñas bovinas) se recolectó en el rastro municipal ubicado en la ciudad de León, Nicaragua como se muestra en la figura 14a y 14b.



(a)



(b)

Figura.14a y 14b. Ubicación del rastro municipal, León. (google map)

4.2 Procedimiento propuesto para la extracción de queratina alfa soluble

4.2.1 Tratamiento de la materia prima

4.2.1.1 Limpieza y lavado:

Con una brocha o cepillo se limpia todo residuo o piel adherida a la pezuña, luego se coloca en un recipiente de plástico conteniendo suficiente agua, se friega con brocha/cepillo y agita manualmente hasta retirar por completo la suciedad.

4.2.1.2 Secado a temperatura ambiente

Dejar secar bajo sol durante 8 horas por 3 días.

4.2.1.3 Cortado y Triturado

Se cortan pequeños trozos de aproximadamente 2cm^3 para obtener una muestra homogénea al momento de pulverizarla en el molino.

4.2.1.4 Secado en horno

Pulverizada la muestra, dejar secar durante 6 horas a $100\text{ }^\circ\text{C}$.

4.2.1.5 Desengrasado

Para esta etapa de desengrasado se utiliza la técnica soxhlet. Se usan cámaras de extracción, balones fondo redondo de 250 ml, mantas calefactoras, refrigerantes, y una mezcla de Hexano-Diclorometano 1:1 (100mL). A cada los balones se agrega 100mL de cada solvente, en las cámaras se colocan cartuchos de papel filtro que contiene 30g de muestra. Se deja a reflujo durante 4 h.

4.3 Procesos químicos de la materia

4.3.1 Hidrolisis alcalina

En un beacker de 250mL Se añade 8 g de sulfuro sódico y 100mL de agua destilada, agitar hasta disolver completamente. Se pesa 10 g de muestra y se agrega a la solución de sulfuro. La cual tiene una duración de un día, manteniendo una agitación constante para que se dé correctamente la hidrólisis.

4.3.2 Oxidación

- ✓ Agregar 6.5mL peróxido de hidrogeno, agita nuevamente de 20 a 30 minutos.
- ✓ Añadir H_2SO_4 al 20% para ajustar el pH a 4.8, y evitar la precipitación de la proteína, por lo que se debe dejar en reposo durante 24 h.

4.3.3 Filtración a vacío

Se realiza para eliminar el contenido de sales del líquido (conteniendo la queratina soluble).

- ✓ Se utiliza una bomba de vacío modelo 8907 para la filtración.
- ✓ En un embudo buchner con papel filtro se añade la materia (liquida), para luego montarlo a un matraz kitasato, así procederemos a la filtración hasta obtener totalmente el líquido. (el residuo restante se puede utilizar como abono en la agricultura).

4.4 Verificación del producto obtenido

4.4.1 Pruebas físicas para el producto obtenido

4.4.1.1 Procedimiento para determinar densidad.

La densidad se determina por el método del picnómetro, solamente se necesita la masa del mismo en tres situaciones diferentes. Todas las masas se pesan en una balanza analítica, con la tapa (balanza previamente verificada).

- ✓ Pesar el picnómetro vacío y anotar su masa (m_p).
- ✓ Enrasar el picnómetro con agua (fluido de referencia) y anotar su masa (m_{p+w}).
Enrasar el picnómetro significa llenarlo completamente, evitando la formación de burbujas en su interior. Al cerrarlo, el nivel de agua subirá por el capilar y ésta rebosará, quedando el capilar también lleno de agua. Una vez el agua haya rebosado, habrá que secar el picnómetro por fuera antes de pesarlo.
- ✓ Enrasar el picnómetro con disolución (líquido cuya densidad queremos hallar) y anotar su masa (m_{p+d}). Se seguirá el mismo procedimiento y se tendrán las mismas precauciones que al enrasar el picnómetro con agua. (Huerta, 2013).

$$\rho_d = \frac{m_{p+d} - m_p}{V_p}$$

Ecuación 3: Fórmula para calcular densidad

4.4.1.2 Procedimiento para medir punto de fusión.

Colocar una pequeña cantidad del producto obtenido en estado sólido en un tubo capilar, colocar el capilar previamente preparado en el fusiómetro, de tal manera que se pueda observar el cambio de estado del producto y anotar la temperatura inicial y la final hasta que cambie de estado sólido a líquido.

Nota: En la etapa de evaporación para convertir en sólido el producto, se recomienda no aumentar la temperatura a más de 100 °C para evitar reacciones violentas y pérdidas del producto obtenido.

4.4.1.3 Procedimiento para medir punto de ebullición.

En una plancha de calefactora se coloca un beacker de 50ml, con un volumen pequeño de muestra y un termómetro, se deja calentar hasta ebullición (p.eb de la queratina hidrolizada 100 a 146 °C). (Santander, 2017).

4.4.2 Pruebas químicas para el producto obtenido.

4.4.2.1 Verificación del pH-metro.

- ✓ Realizar el procedimiento de encendido a como indica el fabricante.
- ✓ Transferir 10 ml de las soluciones buffer a un Beaker de 50 ml.
- ✓ Ajustar la temperatura de las soluciones buffer de pH 4.01 y 7.00 a 25°C.
- ✓ Proceder a verificar primeramente con buffer 7.00 sumergiendo el electrodo a la solución, después de la lectura, enjuagar y secar el electrodo para proceder a verificar con el buffer pH 4.01.
- ✓ Anotar la respuesta del equipo y su pendiente.
- ✓ Hacer la verificación (paso 1-5) una vez antes de realizar las lecturas de la muestra. (Pérez, 2016)

4.4.2.2 Procedimiento para medición de pH.

- ✓ Transferir 10 ml de la muestra en un beacker de 50 ml.
- ✓ Sumergir el electrodo a la solución de muestra, enjuagar y secar el electrodo.
- ✓ Anotar las respuestas del equipo.

“Nota: Realizar la verificación antes de medir pH a la muestra”. (Pérez, 2016)

4.4.3 Pruebas organolépticas a la muestra.

4.4.3.1 Color y Olor.

Observar el cambio de color durante cada etapa y anotar el olor característico que se desprende en el proceso.

4.4.3.2 Apariencia y textura.

Anotar cualquier cambio que se observe en cada etapa (si es viscoso, denso, si tiene precipitados, coloides)

5 Resultados y discusión

A partir de la combinación de los métodos de Shindai y Sulfuro sódico se elaboró un nuevo procedimiento, experimentando con nuevas cantidades de muestra, de concentración de extractante, y volumen de oxidante, esto debido a que se realizaron ensayos de acuerdo a las cantidades establecidas en los métodos originales, y no se obtuvo resultados satisfactorios. La tabla 5 muestra las cantidades y las relaciones entre gramos de muestra, concentración de extractante y volumen de oxidante establecidos por el método Na_2S y los primeros ensayos realizados haciendo cambios en las cantidades.

Tabla.5: resultado de ensayos previos

| Gramos de muestra | Concentración de Extractante | Volumen de Oxidante (mL) | Acidular con ácido sulfúrico 20% | Volumen de α Queratina Obtenido |
|-------------------|------------------------------|--------------------------|----------------------------------|---|
| 5g | 3% | - | - | Ninguno (Se evaporo en la etapa de hidrolisis) |
| 5g | 6% | 2.5mL | - | Ninguno (Se precipito en la etapa de oxidación, formación de espuma). |
| 5g | 6% | 5mL | 40 gotas | 3 mL, líquido denso, apariencia viscosa, color blanco turbio. |

El procedimiento realizado para la obtención de α Queratina, se detalla el siguiente flujograma:

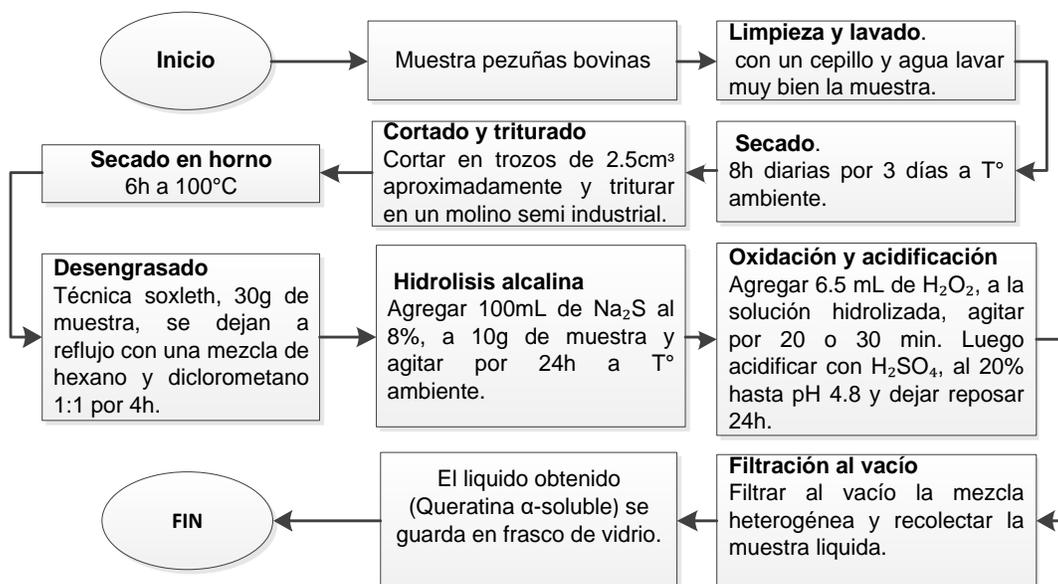
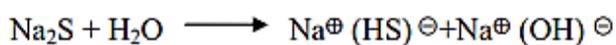


Figura. 15: Flujograma del procedimiento propuesto.

Hidrólisis alcalina de la materia prima

Al disolver sulfuro de sodio en agua, la reacción produce una solución de sulfidrato de sodio (NaSH) en un medio fuertemente alcalino (hidróxido de sodio, NaOH).



Cuando la muestra es sometida a la acción de sulfuro sódico en solución, el ion sulfidrilo reacciona con la proteína cistina rompiendo los enlaces disulfuros y generando así la proteína degradada cisteína (tioles), la forma reducida de la cistina.

La reacción que favorece la degradación de la queratina es la siguiente y se muestra en la figura 16:

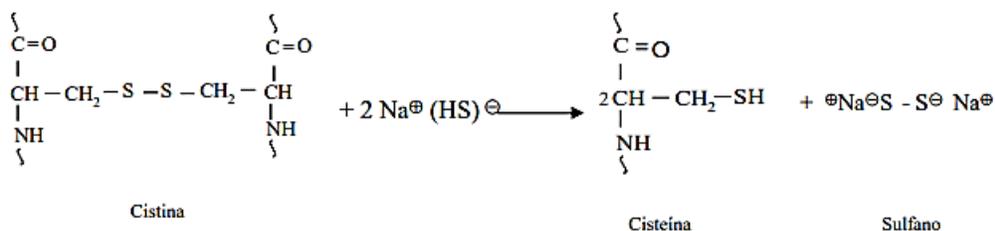


Figura.16. Reacción de reducción de cistina a cisteína. (Wade, 2008, pag.170)

Por otro lado, la figura 17 muestra la reacción del sulfhidrato de sodio (NaSH), que también reacciona con la cisteína producida haciendo que sea neutralizada y se produzca

sulfuro de hidrógeno gaseoso. No todo el sulfuro de hidrógeno producido se desprende al medio, provocando de este modo que se necesite mayor cantidad de sulfhidrato de sodio.

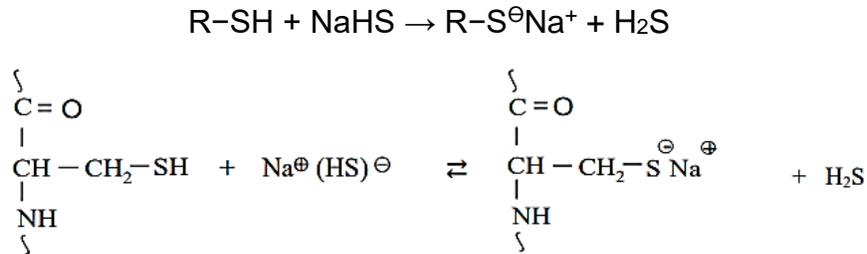


Figura. 17. Reacción de Salida de H₂S. (Wade, 2008, pág.171)

Por su parte, los iones hidróxilos del medio básico, de igual forma reaccionan colaborando a la neutralización de la cisteína. En la figura 18 se muestra la reacción.

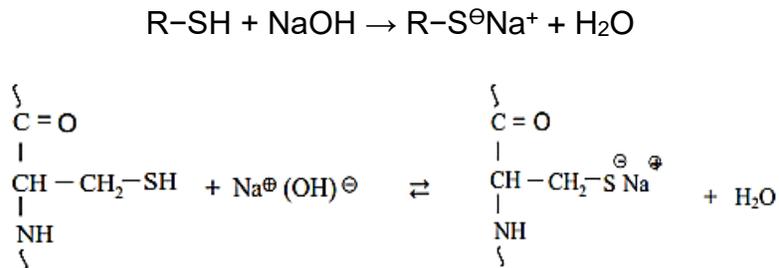
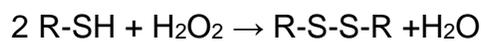


Figura.18. Reacción de neutralización de la queratina. (Wade, 2008, pág.170)

Oxidación

El grupo sulfidriilo (-SH) de la cisteína es muy reactivo. Esto permite que se pueda llevar a cabo una reacción de oxidación reversible que reestablezca nuevamente la unión disulfuro de la cistina. La oxidación de dos moléculas que contiene cisteína forma cistina, que contienen el enlace disulfuro. El enlace puede producirse en una única cadena para formar un anillo o entre dos cadenas separadas para formar un puente intermolecular. Los puentes disulfuro ayudan a estabilizar muchos polipéptidos y proteínas. Los tioles libres se oxidan con H₂O₂ al 30% para formar la unión entre los disulfuros y restaurando así la cistina. La reacción que tiene lugar es la siguiente y se muestra en la figura 19:



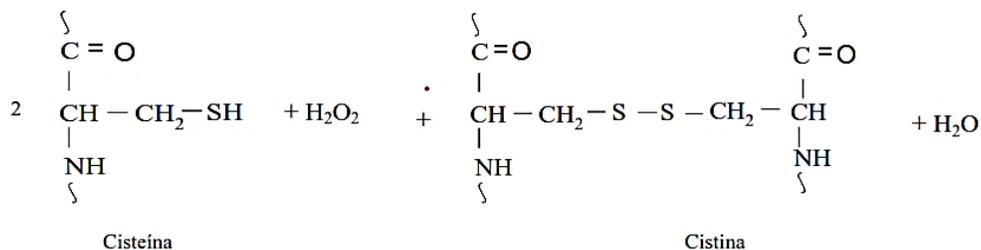
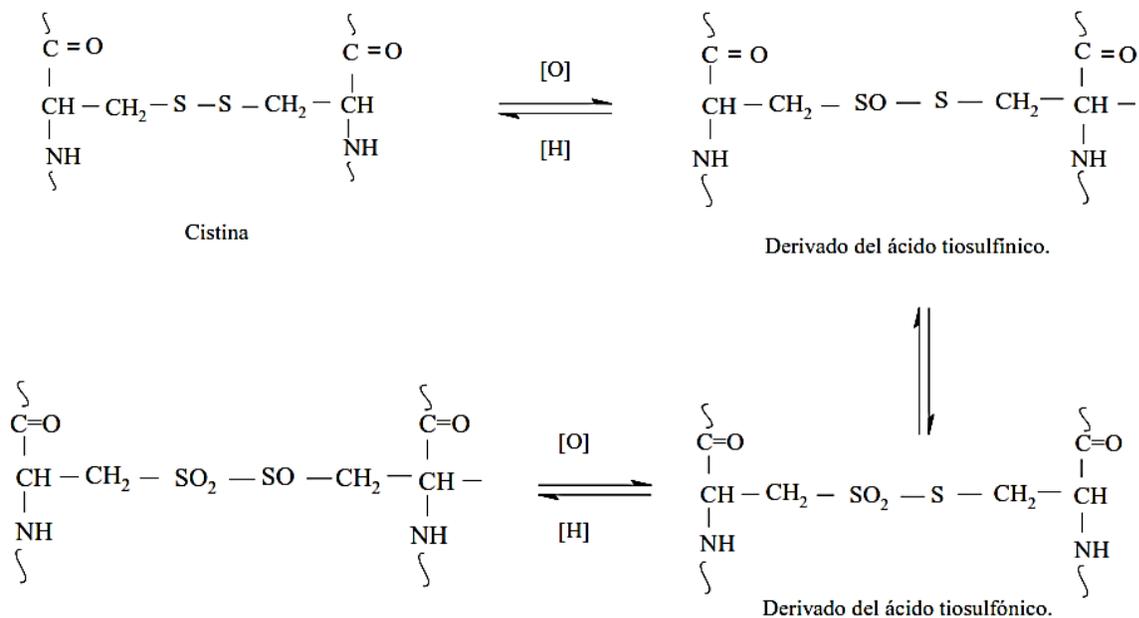
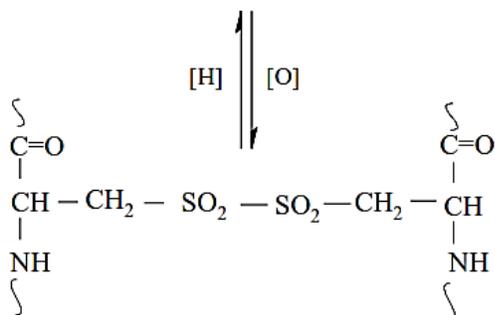


Figura. 19: Reacciones de formación de disulfuro

A continuación, el grupo disulfuro de la cistina nuevamente formada, se oxida en medio ácido (ácido sulfúrico) para la formación de sulfinilsulfona. Para la extracción de queratina de uso cosmético, la oxidación debe producirse solamente hasta el grupo sulfóxido de los sulfuros de la cistina, que es la forma en que finalmente es extraída la queratina alfa. El H₂O₂ al 30%, en medio ácido, oxida un sulfuro a sulfóxido en los rangos de temperatura de 25°C hasta 100°C, es decir, que aunque la reacción se dé a temperatura ambiente o esté sometida a calentamiento, siempre se va a producir la formación de sulfóxido como se muestra en la figura 20. El siguiente mecanismo presenta la reacción con ácido sulfúrico hasta la formación de sulfinilsulfona





Sulfinilsulfona.

Figura. 20: mecanismos de reacción de oxidación de disulfuros.

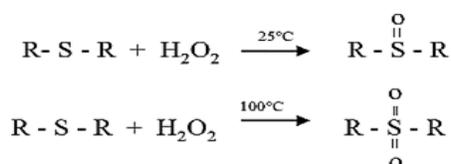


Figura. 21. Reacción de Oxidación de sulfuro (Wade, 2008, pág.170)

Se realizó un análisis factorial para valorar los efectos que producía la variación de la cantidad de muestra, la concentración de extractante y el volumen de oxidante. Y de esta manera establecer qué factores influyen al momento de realizar el procedimiento de extracción. En la tabla 6 se muestra los factores a analizar.

Tabla. 6: Factores a analizar

| X | Y | Z |
|-------------------|------------------------------------|--|
| Gramos de muestra | concentración de Na ₂ S | Oxidación (H ₂ O ₂) |
| 5 g (-) | 6 % (-) | 5ml (-) |
| 10g (+) | 8% (+) | 6.5ml (+) |

En base a la ecuación (2), ($2^n = 2^3 = 8$) se determinó el número de experimentos en función de los factores objetos de estudio, siendo n el número de factores y 8 el número de experimentos a como se refleja en la tabla 7.

Tabla. 7: Número de experimentos y condiciones de los mismos.

| No. Experimentos | X | Y | Z |
|------------------|---|---|---|
| 1 | - | - | - |
| 2 | + | - | - |
| 3 | - | + | - |
| 4 | + | + | - |
| 5 | - | - | + |
| 6 | + | - | + |
| 7 | - | + | + |
| 8 | + | + | + |

Una vez establecidas las condiciones de los experimentos, se realizó las interacciones correspondientes sugeridas en la tabla 8.

Tabla. 8: Interacciones XY, XZ, YZ, XYZ.

| No. Exp | XY | XZ | YZ | XYZ |
|---------|----|----|----|-----|
| 1 | + | + | + | - |
| 2 | - | - | + | + |
| 3 | - | + | - | + |
| 4 | + | - | - | - |
| 5 | + | - | - | + |
| 6 | - | + | - | - |
| 7 | - | - | + | - |
| 8 | + | + | + | + |

La combinación de los experimentos en diferentes proporciones nos brinda información acerca del efecto que estos tienen en la obtención de la queratina al momento de la extracción utilizando el método propuesto.

En la tabla 9 se muestran los resultados en volúmenes de queratina α -soluble obtenidos al realizar las combinaciones resultantes del diseño experimental factorial. Se puede

apreciar que en las combinaciones donde el volumen de extractante es menor, aunque la cantidad de muestra sea alta y el volumen de oxidante sea alto, el volumen obtenido de queratina alfa es relativamente bajo. Sin embargo, cuando el volumen de extractante y el oxidante son altos, aunque la cantidad de muestra sea bajo el volumen obtenido de queratina alfa es significativamente mayor que en el caso anterior. Y al final cuando los elementos estudiados se encuentran en mayor proporción, las cantidades de queratina obtenidas son mucho mayores, por lo que se puede ver que la cantidad de extractante y oxidante juegan un papel importante en la obtención de la proteína a partir de pezuña bovina aplicando el método propuesto; es decir, que con 10g de muestra, la concentración de extractante no debe ser inferior al 8% y el volumen de oxidante no menor de 6.5 mL a la concentración establecida.

Tabla. 9: Resultados de volúmenes obtenidos

| N° Exp. | X | Y | Z | α-queratina (mL) | | Volumen total (mL) |
|---------|-----|----|----------|------------------|-------|--------------------|
| | | | | rep.1 | rep.2 | |
| 1 | 5g | 6% | 5ml | 10 | 9.8 | 19.8 |
| 2 | 10g | 6% | 5ml | 18.6 | 18.3 | 36.9 |
| 3 | 5g | 8% | 5ml | 12 | 12.3 | 24.3 |
| 4 | 10g | 8% | 5ml | 40 | 40.3 | 80.3 |
| 5 | 5g | 6% | 6.5ml | 9.3 | 9.1 | 18.4 |
| 6 | 10g | 6% | 6.5ml | 38.5 | 38.4 | 76.9 |
| 7 | 5g | 8% | 6.5ml | 48.4 | 48.7 | 97.1 |
| 8 | 10g | 8% | 6.5ml | 56.2 | 56.1 | 112.3 |
| | | | varianza | 331.33533 | total | 466 |

Los resultados del análisis de varianza nos permiten separar la variación total en la que contribuye cada factor en el experimento, para observar si las variables (cantidad de muestra, concentración de extractante, y volumen de oxidante) tienen un efecto significativo en el resultado del volumen total obtenido de queratina alfa soluble, ha como se observa en la tabla 10.

ANOVA

H0 Los efectos no son significativos

H1 Al menos un efecto es significativo

Donde:

SC Ajust:

MC Ajust:

MS: cuadrado medio

Tabla. 10: Análisis de varianza

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor FC | Valor p |
|-----------------------------|----|-----------|-----------|----------|---------|
| Modelo | 7 | 4969.80 | 709.97 | 24694.66 | 0.000 |
| Lineal | 3 | 4272.36 | 1424.12 | 49534.64 | 0.000 |
| X | 1 | 1346.89 | 1346.89 | 46848.35 | 0.000 |
| Y | 1 | 1640.25 | 1640.25 | 57052.17 | 0.000 |
| Z | 1 | 1285.22 | 1285.22 | 44703.39 | 0.000 |
| Interacciones de 2 términos | 3 | 275.14 | 91.71 | 3189.97 | 0.000 |
| X*Y | 1 | 1.21 | 1.21 | 42.09 | 0.000 |
| X*Z | 1 | 0.02 | 0.02 | 0.78 | 0.402 |
| Y*Z | 1 | 273.90 | 273.90 | 9527.04 | 0.000 |
| Interacciones de 3 términos | 1 | 422.30 | 422.30 | 14688.78 | 0.000 |
| X*Y*Z | 1 | 422.30 | 422.30 | 14688.78 | 0.000 |
| Error | 8 | 0.23 | 0.03 | | |
| Total | 15 | 4970.03 | | | |

En esta tabla 10 podemos observar que los valores calculados de la distribución de Fisher son muy altos, a excepción de la interacción XZ (gramos de muestra-volumen de oxidante). Esto quiere decir que casi todos los efectos son altamente significativos. Por tal razón se acepta la hipótesis alternativa, "Al menos un efecto es significativo".

El gráfico de Pareto que se muestra en la figura 22 refleja el efecto que existe entre las variables, es decir, las tres variables son significativas para este proceso de extracción, porque son las que contribuyen en mayor medida en el resultado final (volumen obtenido de queratina alfa). Es decir, que variar cualquiera de las variables provocará alteraciones en el volumen del producto obtenido. En cuanto a las interacciones, éstas también provocan efectos, pero no comparado con los que generan cada una de las variables de forma singular.

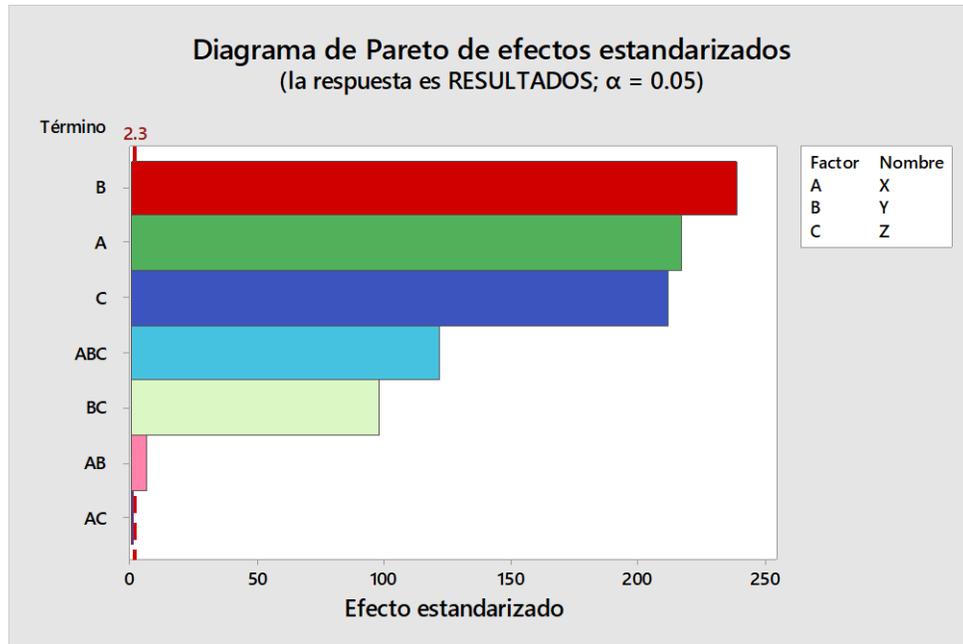


Figura.22: Gráfico de Pareto o efecto estándar.

Donde:

A: gramos de muestra

B: concentración de extractante

C: volumen de oxidante

Para corroborar lo antes mencionado, en la figura 23 el gráfico de efectos estandarizados se muestra los puntos de los efectos significativos y no significativos.

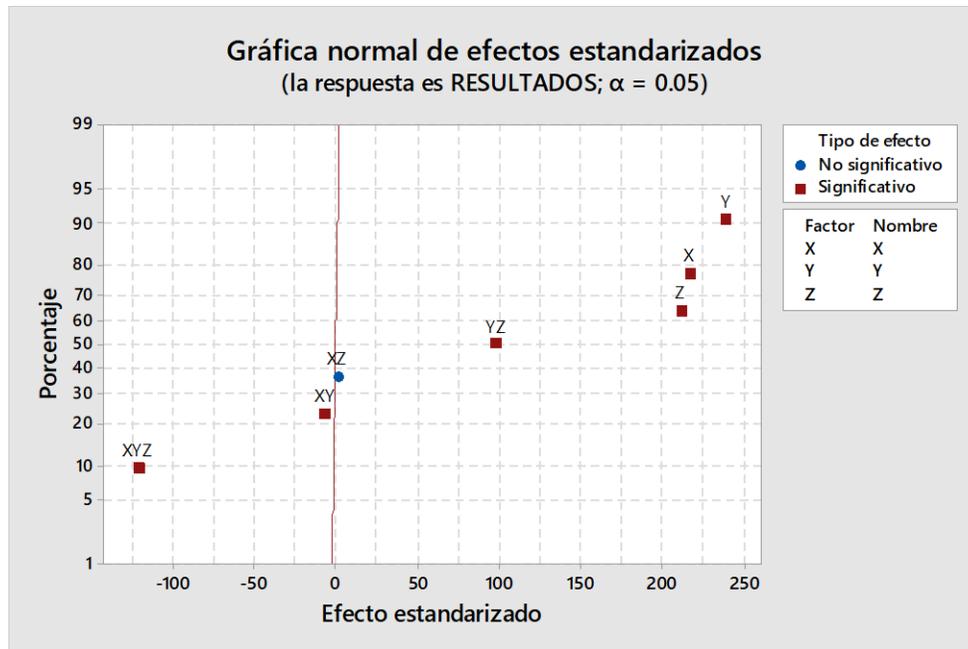


Figura. 23: grafico de efectos estandarizados

A continuación, en la tabla 11 se muestran los resultados de las pruebas realizadas al producto obtenido. Como se puede observar los valores de pH se encuentran claramente dentro del rango de valores de referencia para alfa queratina, no así los valores correspondientes a los puntos de fusión, ebullición, y densidad; que para la mayoría de los experimentos (experimentos del 1 al 6), se encuentran ligeramente por debajo del límite inferior reportado por la bibliografía; y que solo para el caso de los experimentos 7 y 8 están congruentes. Esto puede deberse a la concentración del extractante sulfuro de sodio, que es el encargado de la ruptura de los enlaces disulfuros para la generación de los intermediarios tioles. Si la concentración de la solución de Na_2S no está en los niveles adecuados ($\geq 8\%$), la reacción con la cistina no es completa. Por último, los volúmenes de queratina extraídos entre las dos replicas son muy similares con respecto a la cantidad de materia prima empleada.

Tabla. 11: Resultados de pruebas físicas y químicas.

| α -queratina (mL) | | pH | | P. fusión (°C) | | P. eb. (°C) | | Densidad (g/cm ³) | |
|--------------------------|-------|-------|-------|----------------|--------|-------------|-------|-------------------------------|-------|
| rep.1 | rep.2 | rep.1 | rep.2 | rep.1 | rep.2 | rep.1 | rep.2 | rep.1 | rep.2 |
| 10.0 | 9.80 | 5.0 | 5.2 | 181.50 | 181.70 | 108.9 | 108.8 | 1.09 | 1.09 |
| 18.6 | 18.3 | 6.2 | 6.7 | 186.10 | 186.21 | 109.0 | 109.0 | 1.10 | 1.08 |
| 12.0 | 12.3 | 6.7 | 6.8 | 185.10 | 185.25 | 108.1 | 108.2 | 1.10 | 1.10 |
| 40.0 | 40.3 | 4.9 | 4.9 | 188.10 | 188.52 | 107.0 | 107.0 | 1.14 | 1.14 |
| 9.30 | 9.10 | 5.1 | 5.3 | 185.20 | 185.33 | 106.9 | 106.8 | 1.08 | 1.07 |
| 38.5 | 38.4 | 5.6 | 5.6 | 189.10 | 189.12 | 109.5 | 109.5 | 1.12 | 1.12 |
| 48.4 | 48.7 | 6.5 | 6.4 | 190.10 | 190.15 | 109.0 | 109.6 | 1.14 | 1.15 |
| 56.2 | 56.1 | 5.8 | 5.8 | 190.30 | 190.23 | 110.0 | 110.2 | 1.16 | 1.16 |

En cuanto a las pruebas organolépticas realizadas al extracto, éstas se encuentran en correspondencia a las características propias de la muestra. Los resultados se reflejan en la tabla 12.

Tabla 12: Resultados de pruebas organolépticas

| Pruebas organolépticas | |
|------------------------|--|
| Olor | característicos a la muestra (olor tenue a sulfuro) |
| Color | café claro |
| Apariencia y textura | Líquido denso, sin formación de coloides ni precipitado. |

6 Conclusión

A partir de los métodos Shindai y Sulfuro sódico se elaboró un nuevo procedimiento por la combinación de ambos acorde a nuestras condiciones de trabajo, para la extracción de queratina alfa soluble contenida en pezuñas bovinas.

Así mismo, la relación entre las variables de extracción de la proteína (gramos de muestra, concentración del extractante, volumen de oxidante), se sometió a un estudio de diseño factorial en el que se encontró que los tres factores tienen significancia en el proceso de extracción, siendo la concentración de extractante el del mayor efecto. Sin embargo, los resultados no son del todo concluyentes porque los resultados son referente a únicamente dos repeticiones.

Finalmente, los valores de las pruebas realizadas al extracto obtenido no son significativamente diferentes a los valores referidos por la bibliografía para estos mismos parámetros de queratina alfa soluble; por lo que, concluimos que el producto obtenido es queratina α -soluble.

7 Recomendaciones

- Realizar un mayor número de repeticiones con el procedimiento propuesto para afirmar con mayor certeza la presencia de la proteína.
- Evaluar otras variables que puedan influir en el procedimiento de extracción.
- Realizar prueba de viscosidad al producto obtenido.
- Comprobar la presencia de la proteína por análisis instrumental para complementar este estudio.
- Implementar el procedimiento propuesto con otras fuentes de queratina para comparar resultados.
- Comparar el procedimiento propuesto, con los métodos ya establecidos para corroborar resultados.

8 Bibliografía.

Ácido Sulfúrico. http://es.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido_sulf%C3%BArico
[Consultado: junio, 2021]

Acuña, R; Alza, D; Nordlund, K and Ramos, J.2004.pezuña bovina. Fisiopatología y profilaxis. Editorial Inter-Medica.

Anker, C. A. (Febrero 28, 1967). Patente nº 3,464,825. Minneapolis, Minn., EE.UU.
Atarés Huerta, L. (s.f.). Determinación de la densidad de. Universidad Politecnica de valencia.

Benítez,R. Proteínas procesos y aplicaciones.
http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572008000200008
[Consultado: marzo, 2021] Champe P, Harvey R, Ferrier D. “Bioquímica” 3ra edición 2007

Carlosama, C. (2010). Asociación colectiva para el desarrollo rural de tierra de campos.
<http://www.cdrtcamos.es/lanatural/compostaje.htm>. [Consultado: Abril, 2021]

Chamizo, J. (1994). Química la ciencia central.
http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen2/ciencia3/htm/sec_4.htm
[Consultado: Abril, 2021]

Chávez; Tenorio (2014). Estudio para la obtención de queratina a partir de plumas de pollo con los métodos de sulfuro de sodio y borohidruro de sodio a nivel de laboratorio. Universidad nacional de ingeniería. Managua-Nicaragua

Chuecon, Carles (2008).«Capítulo 6: Análisis factorial»Nuevos métodos de análisis multivariante. CMC Edición

Claudio, B. (2009). *Industria y ciencia*. Recuperado el 10 de febrero de 2012, de: http://www.revistavirtualpro.com/files/ED_200912.pdf

Dvorkin, J. (2010). Bases fisiológica de la práctica médica. México: Panamericana pp 47-51.

Escobedos, H. (2007). Manual de prácticas de laboratorio de química. 4ª ed. Chihuahua, México. Universidad Autónoma de Chihuahua pp 19-22.

Favela, (2012). Sulfuro de Sodio. Recuperado el 10 de Octubre de 2012, de: <http://fagalab.com/Hojas%20de%20seguridad/sulfuro%20de%20sodio.pdf>

Florido, J. (2010). *Procedimiento-obtencion-microfibras-queratina-partir-residuos-ganaderos*. Recuperado el 20 de Agosto del 2011, de: <http://patentados.com>

García, T. (2010). *Proteínas*. El Pequeño Larousse Ilustrado. México: Larousse. pp. 1824

Genoma Sur. (2010). Estructura Cuaternaria. Recuperado el 16 de Septiembre de 2012, de <http://www.genomasur.com/lecturas/Guia02-2.htm>

Gloobe, H. Anatomía Aplicada del Bovino. San José- Costa Rica: Il CA, 1989, pp. 59-44.

Gómez M Latxa cara negra y cara rubia". Catálogo etnológico. Razas Ovinas. http://www.nekanet.net/razas/latxa_c.htm

Huertas-Díaz., W. A., & Quintero-Curvelo, G. A. (2012). Extracción de queratina a partir de las plumas de pollo en el departamento del Meta. Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Universidad de los Llanos, Colombia.

M. Rossberg, (2008) Ficha internacional de seguridad química del Cloruro de Metileno. Ec. (Consultado: abril, 2021)

Marín., K. d. (Octubre, 2014). Estudio para la obtención de queratina a partir de plumas de pollo con los métodos de sulfuro de sodio y borohidruro de sodio a nivel de laboratorio. Managua, Nicaragua : Universidad Nacional de Ingeniería .

Perez, L. S. (2016). Extracción de colágeno y queratina a partir de cascos de bovino como método de aprovechamiento de los residuos generados en el camal municipal de riobamba. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.

Peróxido de hidrógeno

http://es.wikipedia.org/wiki/Per%C3%B3xido_de_hidr%C3%B3geno [Consultado: junio, 2021]

Publicaciones textiles. (2007). Recuperado el 20 de Septiembre de 2012, de http://www.aduanasmexico.com.mx/cgi-bin/ctarnet/notas_ex/not_2830.html.

Rojas Pérez, Orlando (6 de junio de 2010). Reactivos. hoja de seguridad. México consultado: mayo, 2021)

Rodríguez, J. (2009). Reducción química de plumas de aves para la obtención de queratina Hidrolizada. Recuperado el 17 de Noviembre de 2011 de [.univalle.edu/.../145-journalboliviano-de-ciencias-07](http://www.univalle.edu/.../145-journalboliviano-de-ciencias-07). Universidad del valle. Bolivia.

Salazar, M. V. (Marzo, 2013). determinación del método para la obtención de queratina cosmética a partir de plumas gallináceas. Quito, Ecuador: Universidad Central de Ecuador.

Santander, J. I. (septiembre, 2017). Obtención de microfibra de Queratina por hidrolisis no térmica, a partir de residuos del faenado de la subespecie Gallus Gallus Domesticus (Gallina Doméstica). la Paz, Bolivia. Universida Mayor de San Andres.

Sulfuro de sodio. http://es.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido_sulf%C3%BArico
[Consultado: junio, 2021]

Wilkins, J., Moore, M., y Rodríguez, D. (1990). Cosmetología de Harry. Madrid: Diaz Santos. [Consultado: Abril, 2021]

yamauchi, K. (1996). Extraction of Keratin from Bovine Hooves. Anna University Chennai. Tamil Nadu India, 30-39.

9 Anexos

9.1 Reactivos

➤ Hexano

·Formula: C_6H_{14}

Peso molecular: 86.17 g/mol

·Densidad (g/ml): 0.66 (a 20 °C)

·Punto de ebullición: 69 °C

·Punto de fusión: -95.6 °C

·Es un compuesto altamente inflamable

·Como vapor irrita a la nariz y garganta; como líquido, irrita a la piel y ojos.

➤ Diclorometano

·Peso molecular: 84,933 g/mol

·Densidad: 1330 kg/m³; 1,33 g/cm³

·Punto de ebullición: 40 °C (313 K)

·Punto de fusión: 177,9 K (-95 °C)

·líquido incoloro, posee un leve aroma dulce

·ampliamente utilizado como disolvente

➤ Sulfuro de sodio (Na_2S)

Peso molecular: 240,2 g/mol

·Densidad a 20°C: 1,85 g/cm³

Punto de ebullición: 920°C

·Punto de fusión: 50 °C

Por descomposición o contacto con ácido puede liberar sulfuro de hidrogeno altamente toxico. Es irritante y corrosivo.

➤ Peróxido de hidrógeno. H_2O_2

·Peso molecular: 34,0147 g/mol

·Densidad: 1,4 g/cm³

·Punto de ebullición: 107 °C

·Punto de fusión: -26 °C

Líquido, incoloro y oxidante fuerte corrosivo.

➤ Ácido sulfúrico (95-97%).

·Peso molecular: 98, 08 g/mol

·Densidad: 1,84 g/cm³

·Punto de ebullición: 610 K (337 C)

Punto de fusión: 283 K (10 C)

·Líquido aceitoso incoloro, inodoro, pero concentrado es sofocante e higroscópico.

9.2 Preparación de soluciones

- Mezcla de hexano y diclorometano

Mezcla desengrasante relación 1:1, en un balón fondo redondo de 250mL se agregó 100mL de hexano y 100mL de diclorometano.

- Sulfuro sódico (Na_2S) 6%

En un beaker de 250 mL que contiene 100mL de agua destilada se añade 8g de sulfuro de sodio y se agita vigorosamente hasta disolver completamente.

- Sulfuro sódico (Na_2S) 8%

En un beaker de 250 mL que contiene 100mL de agua destilada se añade 8g de sulfuro de sodio y se agita vigorosamente hasta disolver completamente.

- Peróxido de hidrogeno (H_2O_2) 30%

Se utiliza 6.5 mL de peróxido de hidrogeno.

- Ácido sulfúrico (H_2SO_4) 20%

En un balón de 50 mL, se agrega cierta porción de agua destilada y se mide 10 mL de ácido sulfúrico en una pipeta volumétrica usando un dispensador, se agrega agua al balón antes de añadir el ácido, aforar con agua destilada.

9.3 Imágenes del procedimiento de extracción.

9.3.1 Etapas de extracción

Paso1. Lavado y recorte de la materia prima



Paso 2. triturado



Paso 3. desengrasado



Paso 4. Hidrólisis alcalina



Sulfuro sódico

Paso 5. oxidación

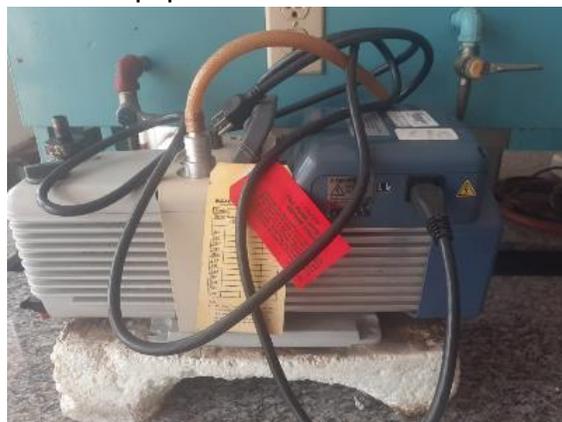


Peróxido, ácido sulfúrico.

Paso 6. Filtración



9.3.2 Equipos



Bomba de vacío



Refrigerante



Bomba de recirculación



Plancha calefactora



Fusiómetro