



**Aprovechamiento del residuo sólido del proceso de descarnado de la industria de la
curtiembre al cromo como base en un proceso de biorrefinería**

Baque Curay, Adrián Oswaldo y Espinal Mera, Steven Antonio

Departamento de Ciencias de la Energía y Mecánica

Carrera de Petroquímica

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de petroquímico

Dr. Rodríguez Maecker, Roman Nicolay

1 de marzo del 2023

Latacunga

Reporte de verificación de contenido

Document Information

Analyzed document	Tesis - Baque-Espinal - ESPEL.pdf (D157764259)
Submitted	2023-02-03 16:47:00
Submitted by	Arancibia Mirari
Submitter email	marancibias@uta.edu.ec
Similarity	5%
Analysis address	marancibias.uta@analysis.arkund.com



Firmado electrónicamente por:
ROMAN NICOLAY
RODRIGUEZ MAECKER

Dr. Rodríguez Maecker, Roman Nicolay

C.C: 1712082120



Departamento de Ciencias de la Energía y Mecánica

Carrera de Petroquímica

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: **“Aprovechamiento del residuo sólido del proceso de descarnado de la industria de la curtiembre al cromo como base para un proceso de biorrefinería”** fue realizado por el/los señor/señores **Baque Curay, Adrián Oswaldo** y **Espinal Mera, Steven Antonio**, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizada en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Latacunga, 1 de marzo del 2023



Firmado electrónicamente por:
ROMAN NICOLAY
RODRIGUEZ MAECKER

Dr. Rodríguez Maecker, Roman Nicolay

C.C: 1712082120



Departamento de Ciencias de la Energía y Mecánica

Carrera de Petroquímica

Responsabilidad de autoría

Nosotros, **Baque Curay, Adrián Oswaldo** y **Espinal Mera, Steven Antonio**, con cédulas de ciudadanía 1726258815 y 1315991388, declaramos que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **Aprovechamiento del residuo sólido del proceso de descarnado de la industria de la curtiembre al cromo como base para un proceso de biorrefinería** es de nuestra autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Latacunga, 1 de marzo del 2023

Baque Curay, Adrián Oswaldo

C.C.: 1726258815

Espinal Mera, Steven Antonio

C.C.: 1315991388



Departamento de Ciencias de la Energía y Mecánica

Carrera de Petroquímica

Autorización de publicación

Nosotros **Baque Curay, Adrián Oswaldo** y **Espinal Mera, Steven Antonio**, con cédulas de ciudadanía N° 1726258815 y 1315991388, respectivamente, autorizamos a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **Título: Aprovechamiento del residuo sólido del proceso de descarnado de la industria de la curtiembre al cromo como base para un proceso de biorrefinería** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi/huestra responsabilidad.

Latacunga, 1 de marzo del 2023

Baque Curay, Adrián Oswaldo

C.C.: 1726258815

Espinal Mera, Steven Antonio

C.C.: 1315991388

Dedicatoria

Steven Antonio Espinal Mera

Dedico este trabajo a quienes me brindaron su apoyo incondicional: mi familia. A mis padres, hermanos y sobrinos que siempre confiaron en mí.

A mis dos grandes amigos: Adrián y Teddy.

Dedicatoria

Baque Curay Adrián

Para mi familia, con especial mención a mi padre.

Para mis amistades.

Agradecimientos

Steven Antonio Espinal Mera

Empiezo por agradecer a Dios y a la vida, que siempre nos ponen en el lugar adecuado, en el momento propicio.

Gracias a mi madre que en todo momento me ayudó a no perder el rumbo, a mi padre por sus valiosos consejos, a mis hermanos por su apoyo y confianza, y a mis sobrinos por darme una razón para mejorar.

Agradezco a los amigos que me acompañaron en esta etapa universitaria: Teddy, José, Bryan y a mi compañero de tesis, Adrián. Gracias por aconsejarme e inspirarme a crecer personal y académicamente.

A mis tutores de tesis: Dr. Roman Rodríguez e Ing. David Luna por sus enseñanzas y consejos.

Por último, pero no menos importante: a mí, por tener el coraje para culminar esta etapa.

Agradecimientos

Baque Curay Adrián

A mi mamá por su constante apoyo y cariño, a mi padre por lo que durante su vida me enseñó, a mi hermano por todo lo que me ayudó y a mi hermana, gracias por todo lo que hicieron por mí.

A las personas que a lo largo de la carrera fui conociendo y apreciando, gracias.

A mi compañero de tesis por la paciencia y camaradería, gracias.

A mis dos tutores por sus aportes y consejos, gracias.

A mi Dios, gracias.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Carátula	1
Reporte de verificación de contenido.....	2
Certificación	3
Responsabilidad de autoría	4
Autorización de publicación	5
Dedicatoria	6
Dedicatoria	7
Agradecimientos.....	8
Agradecimientos.....	9
Índice de contenido	10
Índice de figuras	13
Índice de tablas.....	14
Resumen.....	15
Abstract.....	16
Capítulo I: Generalidades.....	17
Introducción.....	17
Antecedentes.....	18
Planteamiento del problema.....	19
Justificación	20
Objetivos.....	21
<i>Objetivo general</i>	21
<i>Objetivos específicos</i>	22
Hipótesis	22
Capítulo II: Marco teórico	23
Curtiduría	23
<i>Desechos de la curtiduría</i>	24
<i>Impacto ambiental</i>	24
<i>Desecho de descarnado</i>	25
<i>Utilidad del desecho de descarnado</i>	25
Biorrefinería.....	27
<i>Procesos de transformación del residuo de descarnado</i>	28
<i>Extracción de proteína como Building block</i>	30

Hidrolizado de proteína.....	30
Quitosano	31
Fibra de abacá	32
Genipín.....	33
Entrecruzamiento (Crosslinking)	34
<i>Biopolímero entrecruzado</i>	34
Diseño experimental	35
Análisis físicos y químicos.....	36
<i>FTIR</i>	36
<i>DSC</i>	37
<i>TGA</i>	38
Estado del arte.....	39
Capítulo III: Metodología.....	41
Equipos, materiales y reactivos	41
<i>Equipos</i>	41
<i>Materiales</i>	41
<i>Reactivos</i>	42
Obtención de la materia prima	42
Proceso de hidrólisis del sebo	43
Contenido de proteínas del hidrolizado.....	44
Extracción de genipín	45
Obtención de Quitosano	48
Diseño experimental	49
Preparación de las bio-membranas	50
Pruebas fisicoquímicas.....	52
<i>Solubilidad</i>	52
Análisis térmicos.....	53
<i>Análisis termogravimétrico (TGA)</i>	53
<i>Calorimetría diferencial de barrido (DSC)</i>	53
Características estructurales.....	53
<i>Espectrometría de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR)</i>	53
Capítulo IV: Análisis de resultados	54
Proceso de hidrolisis del sebo	54
Contenido de proteínas del hidrolizado.....	55
Extracción de genipín	56

Obtención de quitosano.....	58
Preparación de las bio-membranas	58
Análisis de FTIR.....	59
<i>FTIR del hidrolizado de proteína</i>	59
<i>FTIR del genipín</i>	60
<i>FTIR del quitosano</i>	62
<i>FTIR de las muestras de bio-membranas</i>	63
Solubilidad.....	65
Análisis del diseño experimental	66
Análisis termogravimétrico	68
Calorimetría diferencial de barrido.....	70
Capítulo V: Conclusiones y recomendaciones.....	72
Conclusiones.....	72
Recomendaciones.....	73
Bibliografía	75
Anexos.....	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Diagrama de flujo del proceso de la curtiembre.....	23
Figura 2 Proceso de hidrólisis	31
Figura 3 Mecanismo de reacción entre genipín y quitosano	34
Figura 4 Esquema del equipo FTIR.....	36
Figura 5 Curva DSC del almidón.....	38
Figura 6 Termograma del oxalato de calcio.....	39
Figura 7 Acondicionamiento del sebo.....	43
Figura 8 Tratamiento de la fruta de la Genipa americana	46
Figura 9 Proceso de extracción del genipín.....	47
Figura 10 Soluciones formadoras de biomembranas.....	51
Figura 11 Espectro IR de la muestra de HFW	60
Figura 12 Estructura química del genipín	61
Figura 13 Espectro IR del genipín extraído	61
Figura 14 Espectro IR del quitosano extraído.....	62
Figura 15 Espectros IR de las muestras de bio-membranas	64
Figura 16 Gráfica normal de los efectos.....	67
Figura 17 Diagrama de Pareto	68
Figura 18 Termograma de la muestra H.....	68
Figura 19 Termograma de la muestra H2	69
Figura 20 Curva DSC de la muestra F2.....	70
Figura 21 Curva DSC de la muestra H.....	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 <i>Productos generados a base de proteínas y aplicaciones</i>	26
Tabla 2 <i>Factores y niveles de estudio</i>	49
Tabla 3 <i>Tratamientos realizados</i>	50
Tabla 4 <i>Cantidad de hidrolizado obtenido</i>	54
Tabla 5 <i>Contenido de proteínas en las muestras</i>	55
Tabla 6 <i>Contenido de humedad de los frutos de la Genipa americana</i>	57
Tabla 7 <i>Contenido de genipín extraído</i>	57
Tabla 8 <i>Características de las soluciones formadoras de bio-membranas</i>	59
Tabla 9 <i>Porcentaje de solubilidad de las muestras</i>	65
Tabla 10 <i>Análisis de varianza</i>	66

Resumen

En esta investigación se propone el uso de proteína hidrolizada obtenida del desecho de descarnado del cuero junto con quitosano y genipín como agente entrecruzante para obtener bio-membranas compuestas reforzadas con fibras naturales de abacá (*Musa textilis*). La proteína hidrolizada se mezcla con quitosano en proporciones determinadas, luego a esta mezcla se añade genipín como agente entrecruzante para iniciar la reacción de entrecruzamiento y luego se agregan fibras de abacá para aportar resistencia mecánica. El procedimiento de hidrolisis del desecho de descarnado consiste en añadir hidróxido de sodio en relación 7:100 respecto a la cantidad de desecho de descarnado para romper las estructuras proteínicas en un lapso corto y con bajo consumo energético. Para la extracción del agente entrecruzante a partir del fruto del árbol *Genipa americana* se describe un método de bajo impacto económico y ambiental desarrollado por los autores del estudio. Las propiedades fisicoquímicas de las bio-membranas fueron determinadas mediante espectroscopía de infrarrojos con transformada de Fourier (FTIR), calorimetría diferencial del barrido (DSC), análisis termogravimétrico (TGA) y pruebas de solubilidad en laboratorio, además de pruebas realizadas a la intemperie para observar los cambios y comportamiento que tienen las bio-membranas en condiciones climáticas normales. Por lo mencionado, esta investigación propone una guía para la utilización del desecho de descarnado de la curtiembre al cromo.

Palabras clave: residuo de descarnado, curtiembre al cromo, agente entrecruzante, bio-membranas compuestas.

Abstract

This research proposes the use of hydrolyzed protein obtained from fleshing waste with chitosan and genipin as a crosslinking agent to obtain composite biomembranes reinforced with natural fibers of abaca (*Musa textilis*). The hydrolyzed protein is mixed with chitosan in proportions determined in this study, then genipin is added to this mixture as a crosslinking agent to start the crosslinking reaction and then abaca fibers are added to provide mechanical strength. The fleshing waste hydrolysis procedure consists of adding sodium hydroxide in a 7:100 ratio with respect to the amount of fleshing waste to break down the protein structures in a short period of time and with low energy consumption. For the extraction of the crosslinking agent from the fruit of the *Genipa americana* tree, a method of low economic and environmental impact developed by the authors is described. The physicochemical properties of the biomembranes were determined by means of Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetric analysis (TGA) and solubility tests in the laboratory, in addition to tests performed outdoors to observe the changes and behavior of the biomembranes under normal climatic conditions. Therefore, this research proposes a guide for the utilization of fleshing waste from the chrome tannery.

Keywords: fleshing waste, chromium tannery, crosslinking agent, composite biomembranes.

Capítulo I

Generalidades

Introducción

La industria de la curtiembre al cromo en la ciudad de Ambato, provincia de Tungurahua genera varios desechos sólidos, entre ellos, el sebo resultante del proceso de descarnado para la obtención de cuero curtido. Los inconvenientes que se presentan en su procesamiento están ligados a factores tales como el contenido de: agua, proteínas, grasas y otros componentes, lo que provoca que se genere mayor cantidad de desechos, generando un impacto negativo para el medio ambiente circundante.

El tratamiento químico del sebo es una alternativa para el aprovechamiento de este residuo con el propósito de procesos de biorrefinería (Mu et al., 2003). Es posible utilizar el sebo tratado químicamente para producir pienso de animales de granja o en otras aplicaciones afines. La presente investigación propone la síntesis de bio-membranas compuestas o *composite* utilizando la proteína del sebo obtenida del tratamiento químico junto con un agente entrecruzante o *crosslinking agent* para generar un material compuesto, partiendo de recursos renovables como fibras naturales y quitosano además del sebo de la curtiembre.

Los materiales bio-compuestos presentan un reto en cuanto a su síntesis debido a la complejidad de la reacción de entrecruzamiento de las estructuras proteicas con polisacáridos (Kluger & Alagic, 2004). Para llevar a cabo el mencionado proceso se usan agentes entrecruzantes provenientes de fuentes renovables, con esto se busca dar utilidad a los desechos y reducir la producción plástico convencional (Sartore et al., 2013).

Las bio-membranas compuestas representan una alternativa sostenible para la producción de empaques, acolchados de cultivos, entre otros materiales poliméricos a partir de recursos renovables, que en el futuro podrían reemplazar a los plásticos convencionales. Un

aspecto importante para considerar es que actualmente estas tecnologías no se emplean en la industria, esto se atribuye a los costos de producción, la escasez de materia prima y la poca cantidad de producto final obtenido.

Por lo mencionado anteriormente, este trabajo propone una ruta para el desarrollo de nuevos materiales a partir del sebo de la curtiembre al cromo mediante el proceso de entrecruzamiento.

Antecedentes

En la última década se han incrementado los estudios para desarrollar nuevos biopolímeros con propiedades similares e incluso mejores que los polímeros convencionales sintetizados a partir de derivados de petróleo. La utilización de fibras naturales o materias primas obtenidas de desechos industriales se considera una forma eficiente de reducir el impacto negativo que tienen los plásticos convencionales (Velde & Kiekens, 2001).

En años recientes se ha investigado el uso de mezclas de hidrolizados de proteína animal proveniente de desechos industriales para sintetizar plásticos a partir de fuentes renovables, estos procesos tratan de introducir en la industria los principios de economía verde. Existen muchas ventajas acerca del desarrollo de bioplásticos, una de las más importantes es la reducción del consumo combustibles fósiles (Katsuhisa & Hamaguchi, 2010).

La síntesis de materiales compuestos a partir de mezclas de hidrolizado de proteína o gelatina utilizan un agente entrecruzante en lugar de un plastificante como se hace habitualmente, la ventaja principal radica en que algunos agentes entrecruzantes pueden obtenerse de fuentes renovables. Actualmente se siguen desarrollando e investigando estos agentes, por su versatilidad y facilidad de aplicación en reacciones con hidrolizados de proteína o gelatina (Sartore et al., 2013).

El uso de hidrolizados de proteína o aminopolisacáridos como el quitosano para la elaboración de películas biodegradables utilizan fibras naturales y aditivos, como óxido de grafeno, que otorgan propiedades mecánicas específicas según la proporción de estos materiales en la mezcla final, esto demuestra que se pueden tener distintas características en los bioplásticos sintetizados (Vlasceanu et al., 2020).

Las aplicaciones de los bioplásticos, biopolímeros o membranas compuestas han tomado gran relevancia para la investigación como para la industria, esto es debido al intento de reducir las cantidades de plásticos de un solo uso y darle utilidad a los desechos industriales para evitar que constituyan fuentes de contaminación. Uno de los campos en que se puede aplicar es en la agricultura, como acolchado para cultivos o como recipiente para plantas en viveros y cultivos de ciclo corto (Pei et al., 2013).

Planteamiento del problema

Hasta el año 2020 diariamente se recolectaron 12.613 toneladas de residuos sólidos en el país, de esta cantidad el 85,6% corresponden a residuos recolectados sin diferenciación, esto se refiere a que no se separan los desechos de acuerdo con su naturaleza orgánica o inorgánica, provocando mayor impacto ambiental (Cando, 2021)(Ecuador en Cifras, 2021).

Los residuos industriales se suman a los desechos generados diariamente por la población del Ecuador, este hecho ha provocado daños al ambiente, además de contribuir a la proliferación de enfermedades. Actualmente el 51% de los GAD municipales disponen los residuos como rellenos sanitarios, mientras que el resto desechan los residuos en botaderos a cielo abierto (Ministerio del Ambiente, 2021).

En Curtiduría Tungurahua, ubicada en el Parque Industrial de la ciudad de Ambato se recolectan aproximadamente 7 toneladas diarias de residuo de descarnado (sebo) mezclado con agua, este desecho recibe un tratamiento para retirar el excedente de agua, siendo la

cantidad estimada, 4 toneladas de residuo sólido. Este es el residuo que presenta mayor dificultad para su reducción debido a la contaminación que provocaría desecharlo sin tratamiento previo. Estos residuos son resultado del crecimiento y desarrollo de la sociedad, estos representan un riesgo para las fuentes naturales de agua y con ello para los seres vivos en general, además de provocar malos olores por la naturaleza del desecho de descarnado. Una de las principales causas del incremento en la generación y acumulación de estos residuos es la creciente demanda de productos industrializados, en este caso, del cuero curtido.

Justificación

Actualmente la industria busca implementar tecnologías y productos amigables con el ambiente, incluyendo aspectos como biodegradabilidad y bajo uso de sustancias nocivas. Los plásticos convencionales son sintetizados a partir de fuentes fósiles, estos materiales cuentan con ventajas como baja densidad y versatilidad para adaptar distintas formas, no obstante, estas ventajas se han convertido en un problema creciente por la acumulación de plásticos en mares y botaderos que atentan contra la naturaleza y la salud de los seres humanos (Song et al., 2009).

Los estudiantes de la carrera de Petroquímica, en conjunto con la empresa Curtiduría Tungurahua buscan reducir las cantidades de desechos industriales utilizándolas como fuentes de materia prima para sintetizar nuevos productos innovadores, contribuyendo a disminuir el impacto ambiental. Este proyecto se suma a los esfuerzos por implementar una economía verde con productos provenientes de fuentes renovables, y en este caso de la utilización de desechos industriales de la industria de la curtiembre.

Los métodos para hidrolizar los residuos proteínicos de la curtiembre pueden dividirse en dos ramas principales: hidrólisis química e hidrólisis enzimática. Ambos procesos presentan

ventajas y desventajas respecto a tiempos de reacción, cantidad de reactivos utilizados, entre otros aspectos (Mu et al., 2003).

Para esta investigación se ha llevado a cabo el proceso de hidrólisis química, para obtener la materia prima principal en el proceso de síntesis de un material compuesto biodegradable para aplicaciones agrícolas.

En favor de reducir el impacto ambiental se escogió un reactivo denominado *crosslinking agent* o agente entrecruzante que se obtiene de fuentes naturales mediante procesos de extracción con solventes que también pueden reutilizarse (Yoo et al., 2011).

Este agente es determinante para iniciar una reacción entre los aminoácidos producidos en la hidrólisis del residuo de descarnado, dando como resultado una película biodegradable que se ha denominado material compuesto. El material compuesto conforma la base para una mezcla entre aminopolisacáridos, proteína hidrolizada, genipín como entrecruzante y fibras naturales para proveer de características como resistencia mecánica y elasticidad (Sartore et al., 2013).

Respecto a la utilización de plastificantes convencionales, se ha omitido el uso de estos productos debido a la contaminación potencial que puede generar su uso en la plastificación de la bio-membrana y en el producto final (Bialecka-Florjańczyk & Florjańczyk, 2007). Por este motivo se busca una alternativa al desarrollo de materiales utilizados en la industria agrícola y en otros campos donde el material sintetizado pueda ser de utilidad.

Objetivos

Objetivo general

Aprovechar el residuo sólido del proceso de descarnado de la industria de curtiembre al cromo como base de un proceso de biorrefinería.

Objetivos específicos

- Aislar la proteína contenida en el residuo de descarnado para obtener proteína hidrolizada.
- Sintetizar una bio-membrana a partir del hidrolizado proteico utilizando un agente entrecruzante y fibras naturales.
- Evaluar las propiedades de la bio-membrana a base de hidrolizado de proteína.

Hipótesis

Es viable la utilización de hidrolizado de proteína obtenido del sebo de la curtiembre para su uso como biopolímero en aplicaciones agrícolas.

Capítulo II

Marco teórico

Curtiduría

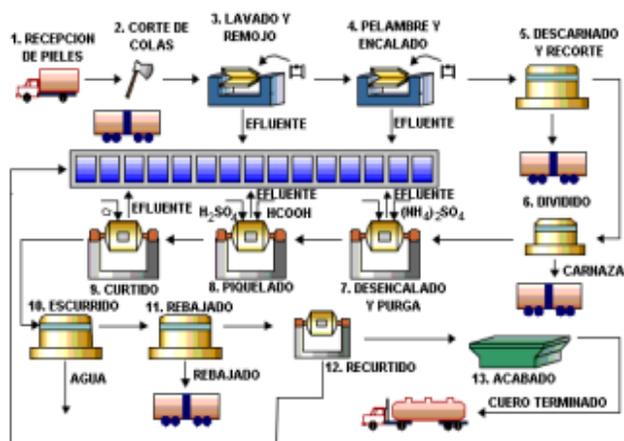
Curtiduría hace referencia al “sitio o taller donde se curten y trabajan las pieles.”

(*Diccionario de La Lengua Española*, n.d., definición 1)

En el Parque Industrial de la ciudad de Ambato se encuentra la empresa Curtiduría Tungurahua, dedicada al tratamiento de las pieles de vacuno para obtener como producto final pieles curtidas mediante el proceso de curtiembre al cromo bajo los estándares de calidad de la normativa ISO 9001 2015.

Figura 1

Diagrama de flujo del proceso de curtiembre



Nota. El grafico representa el proceso industrial para obtener pieles curtidas. Tomado de *Estudio de potenciales impactos ambientales y vulnerabilidad relacionada con las sustancias químicas y tratamiento de desechos peligrosos en el sector productivo del Ecuador* (p. 130), por (Ministerio del Ambiente, 2021).

En la Figura 1 se muestra el esquema que describe el proceso por el que pasan las pieles crudas hasta convertirse en cuero curtido según la Clasificación Industrial Uniforme de Todas las Actividades Económicas (CIIU) Revisión 3.1 dentro de la categoría D-1820 “Adobo y teñido de pieles; fabricación de artículos de piel”. En dicho proceso se generan desechos sólidos además de afluentes de agua contaminada con sales y otras sustancias. Los residuos sólidos que se forman son: desecho de descarnado, desecho de pelambre, desecho de rebajado, *wetblue* y polvo de raspado de cuero.

Desechos de la curtiduría

Dentro del curtido de pieles animales, los residuos están presentes en todos los procesos y estos pueden ser sólidos o líquidos. Por residuos sólidos se comprende aquellos como el pelo, sebo y tejidos conectivos, carnaza, viruta de *wetblue* y polvo de cuero procedentes del proceso de pelambre, descarnado, dividido, rebajado y lijado, respectivamente. Los residuos líquidos engloban agua, sales, sangre, estiércol, sulfuro de sodio, cal, sales de cromo, ácidos, pigmentos, aceites, entre otros, que pueden producirse en las distintas etapas del proceso de curtido al cromo (Ministerio del Ambiente, 2021).

En Curtiduría Tungurahua, solo en el proceso de descarnado se producen diariamente 7 toneladas de residuo mezclado con agua, a dicho desecho se le retira el agua y finalmente se obtiene un total de 4 toneladas aproximadamente de residuo sólido que contiene materiales perjudiciales para el ambiente.

Impacto ambiental

En el mundo, la industria de la curtiembre usa casi en su totalidad sales de cromo terciario (Cr III) para curtir las pieles. Las sales de cromo son nocivas para los seres vivos por su toxicidad, riesgo de promover el desarrollo de cáncer en humanos, entre otros perjuicios que pudiera presentar el uso de estas sustancias. Según lo expuesto, el principal problema en la

industria de la curtiembre al cromo es la inminente contaminación de los afluentes de agua (Famielec, 2020).

Los principales aportes negativos de la industria de la curtiembre al cromo son: afectación a la calidad de agua y generación de desechos sólidos (Ministerio de Ambiente Ecuador, 2011).

Desecho de descarnado

El residuo que se produce en el descarnado es un desecho que contiene grasa y proteínas el cual varía mucho acorde a la calidad del cuero del animal que se desea procesar (Kundendran et al., 2017).

El descarnado es el desecho que se produce en mayor cantidad y contiene sulfuro de sodio el cual presenta propiedades tóxicas y corrosivas, lípidos (7-15%), proteínas (50-60%) y una considerable cantidad de agua (Puhazhselvan et al., 2022).

Respecto al sebo o residuo de descarnado, actualmente la mayoría de las industrias dedicadas al curtido del cuero sencillamente lo depositan en contenedores adecuados y terminan en los basureros municipales, contaminando las fuentes de agua, el suelo y el aire (Yilmaz et al., 2007).

Varios estudios realizados encaminan a utilizar dichos residuos y darles aplicaciones con valor agregado como creación de biopolímeros, adhesivos, fertilizantes, alimentación animal, industria cosmética y aplicaciones farmacéuticas (Parisi et al., 2021).

Utilidad del desecho de descarnado

El sebo, por su composición, es utilizado como fuente de lípidos para la producción de biodiesel. Los lípidos a igual que la proteína se pueden obtener sometiendo a un proceso de hidrólisis (Kundendran et al., 2017).

Luego del asilamiento de los lípidos y el proceso de transesterificación directa con catalizador, se puede obtener un biodiesel con propiedades como: densidad, viscosidad cinemática, punto de turbidez, índice de acidez, contenido de agua, punto de inflamación y residuo de carbono, mejores que los obtenidos con otras fuentes de lípidos como los residuos de la palma africana (Kundendran et al., 2017).

El sebo también es utilizado como fuente de proteínas para la producción de varios productos como muestran en la Tabla 1:

Tabla 1

Productos generados a base de proteínas y sus aplicaciones

Productos generados	Aplicaciones
Colágeno	Aglutinante, texturizante alimentario, tripas comestibles para embutidos, Portador de fármacos y sustituto de la carne
Geles de colágeno	Aplicación clínica (administración de fármacos / vendaje de heridas)
Dispersiones de colágeno	Uso biomédico, Recuperación medioambiental
Hidrolizados de colágeno	Como peptonas, bio-estimuladores, material de envasado, polímero biodegradable, acondicionador del suelo/fertilizantes/cosméticos, materiales de construcción
Fibras de colágeno	Material adsorbente, Fabricación de papel

Productos generados	Aplicaciones
Corium Colágeno	Tripas comestibles para salchichas
Polvo de piel	Aves de corral y piensos
Gelatina	Fotografía, Detergentes
Colágeno estabilizado con glutaraldehído	Adsorbente en el tratamiento de aguas residuales

Nota. En la tabla se muestran los productos que podrían generarse a partir de los residuos proteínicos de la industria de la curtiembre. Tomado de Recovery and utilization of proteinous wastes of leather making: a review (p.156), por (Sundar et al., 2011).

Biorrefinería

La biorrefinería es aquel complejo industrial que tiene como propósito transformar la biomasa o residuos de diferentes sectores industriales en productos con valor agregado ya sean biomateriales, productos químicos o energía (Clark & Deswarte, 2014).

En la búsqueda de materias primas y procesos industriales, limitando el daño ambiental aparece la biorrefinería, donde se plantea utilizar materias primas provenientes de fuentes renovables. Otro enfoque que se plantea en el siglo XXI es la transformación de desechos industriales en fuentes energéticas u otros productos de valor agregado, teniendo como finalidad principal la reducción de contaminación provocada por residuos sólidos.

Dentro de las materias primas que se pueden usar para una biorrefinería se encuentra la biomasa proveniente de residuos del hogar, cultivos agrícolas, madera y de las distintas industrias como la curtiduría al cromo (Ferreira, 2017).

El uso del residuo de descarnado proveniente del proceso de curtiembre al cromo se ha planteado como una alternativa para su transformación química, de forma que constituya la

base para un proceso de biorrefinería tomando en cuenta las alternativas que impliquen bajo impacto ambiental.

Procesos de transformación del residuo de descarnado

El termino hidrólisis hace referencia a la transformación química de la materia prima en un producto con características distintas a las que tenía en principio. De forma generalizada, se trata de una transformación química que envuelve una reacción caracterizada por un cambio en la estructura química del sustrato (Speight, 2018).

Comúnmente, en la hidrolisis química se trabaja con soluciones a altas concentraciones como hidróxidos de sodio o calcio y ácidos como sulfúrico o clorhídrico, estos deben estar bajo temperatura y presión controladas para así lograr la efectiva rotura de los enlaces peptídicos. Dichos resultados no siempre son los esperados debido a que se puede producir la degradación del triptófano o la transformación de la arginina en citrulina (Cavani et al., 2017).

Considerando la materia prima utilizada en esta investigación, se abordan los principales métodos de hidrólisis que pueden realizarse para la transformación del residuo de descarnado en hidrolizado de proteína.

Hidrólisis enzimática.

Varios autores reportan este método utilizando como catalizadores las enzimas, entre las más utilizadas se encuentran proteasa y alcalasa.

Este método de hidrólisis permite obtener un producto con mayor selectividad, sin embargo, representa varios retos en consecuencia de la utilización de enzimas, un ejemplo de esto es la estabilidad del pH al que será llevado a cabo el proceso (Pecha et al., 2021).

Otro aspecto para considerar respecto a este método es el tiempo y las limitaciones de la actividad enzimática frente a fluctuaciones de temperatura, cantidad de enzimas, entre otros factores que pudieran afectar al resultado.

Hidrólisis química.

Este proceso puede ser dividido en dos ramas principales: hidrólisis ácida e hidrólisis básica.

Para la hidrólisis ácida pueden utilizarse: ácido acético (CH_3COOH), ácido sulfúrico (H_2SO_4), ácido clorhídrico (HCl), entre otros ácidos según la materia prima que vaya a ser procesada. Respecto al sebo de la curtiembre, se ha reportado un procedimiento de hidrólisis con ácido acético, utilizando concentraciones de ácido relativamente bajas (Akter et al., 2020).

Un aspecto importante acerca de esta forma de hidrólisis es que el tiempo necesario es semejante al de la hidrólisis enzimática, no obstante, presenta muy poca complejidad en su aplicación.

La hidrólisis básica requiere de compuestos alcalinos como: hidróxido de sodio (NaOH), óxido de calcio (CaO), óxido de magnesio (MgO), entre otras sustancias básicas. Este procedimiento ha sido llevado a cabo para obtener hidrolizado de proteína a partir del sebo de la curtiembre al cromo en tiempos que comprenden 3, 6 y 24 horas a temperaturas que no superan los $100\text{ }^\circ\text{C}$ (Mu et al., 2003).

Este método de hidrólisis se presenta como una alternativa sencilla de practicar, además de utilizar bajas cantidades de álcali, promoviendo la disminución de residuos contaminantes.

Extracción de proteína como Building block

Se ha reportado el uso de plumas de ganso para transformarlas en hidrolizado rico en queratina como base para la síntesis de membranas compuestas con metil celulosa usando glicerol como plastificante (Liebeck et al., 2017).

En otra investigación se ha utilizado la proteína extraída de la piel del salmón como base para la preparación de andamios porosos entrecruzados de gelatina – colágeno – genipín utilizando una solución de quitosano y dióxido de carbono (Liebeck et al., 2017).

La proteína presente en el sebo puede ser obtenida por los métodos antes mencionados. Para el desarrollo de la investigación, el método utilizado para la obtención de hidrolizado de proteína fue la hidrólisis alcalina. La evidencia bibliográfica muestra la versatilidad del hidrolizado de proteína o estructuras que contienen aminoácidos como colágeno y queratina como base para sintetizar membranas compuestas, inclusive biomateriales destinados a aplicaciones médicas.

En la presente investigación se toma como base la proteína hidrolizada obtenida a partir del sebo de la curtiembre, dado el antecedente de aplicabilidad y compatibilidad con distintos reactivos y métodos de síntesis para obtener membranas compuestas.

Hidrolizado de proteína

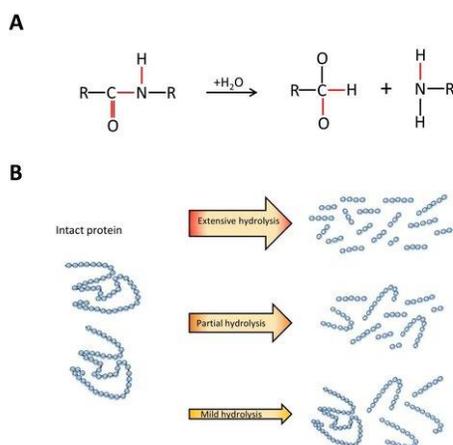
El hidrolizado de proteína es el producto de los distintos tipos de hidrolizado ya sea química o enzimática, rico en nitrógeno y aminoácidos que son utilizados para la fabricación de biopolímeros por su aporte al comportamiento hidrofílico (Havstad, 2020).

Como se ha mencionado anteriormente, la hidrólisis implica un cambio en la estructura química del sustrato o reactante, para esta investigación el sustrato es el sebo de la curtiembre que posterior al proceso de transformación con álcali, se convierte en proteína hidrolizada.

La intención del proceso de hidrólisis no solo abarca la transformación de la estructura proteínica, también promueve el mejoramiento de características como solubilidad, viscosidad y facilidad de dispersión (Ibarz et al., 2008).

Figura 2

Proceso de hidrólisis



Nota. En la imagen se presenta un esquema gráfico del proceso de hidrólisis de proteínas.

Tomado de *Immunomodulatory Protein Hydrolysates and Their Application* (p. 2), por (Kiewiet et al., 2018).

Como se muestra en la Figura 2, el proceso de hidrólisis consiste en romper las cadenas de proteínas en aminoácidos más pequeños con el propósito de facilitar el proceso reactivo, entre otras propiedades antes mencionadas.

Quitosano

El quitosano es un biomaterial abundante que puede ser obtenido de diferentes caparzones de crustáceos o insectos, se obtiene desacetilando la quitina en un medio básico y con temperatura controlada, dicho parámetro es el que determinará las características que aportará en el uso destinado (Mourya & Inamdar, 2008).

Por sus propiedades, el quitosano es utilizado en distintas áreas cómo: la industria de alimentos, bebidas, agricultura, farmacéutica y tratamientos de agua (Velásquez, 2006).

El quitosano también tiene aplicaciones médicas, por ejemplo, mediante un fotoentrecruzamiento de los grupos azida y lactosa con luz ultravioleta se cargó paclitaxel para formar un hidrogel insoluble que pueda transportar medicamentos sistemáticos que se liberen acorde a la biodegradación del hidrogel, controlando así la cantidad de medicamento y la duración del tratamiento (Ishihara et al., 2006).

Se puede emplear para la fabricación de hidrogeles con gelatina que permita obtener membranas suaves, con buenas propiedades mecánicas, térmicas y de hinchamiento. Presentan gran compatibilidad para la adhesión celular por lo que muchos estudios concluyen que son pilares fundamentales para desarrollo de aplicaciones en la ingeniería tisular (Nagahama et al., 2008).

El quitosano también puede ser reticulado mediante genipín generando hidrogeles fluorescentes con el característico color azul, presenta baja citotoxicidad lo cual no representa un peligro para las células animales ni humanas. Debido a las propiedades que presentan estos dos componentes, se puede utilizar en patologías de periodontitis, tratamiento de cataratas, disfunción hepática, reparación de heridas y hasta la regeneración nerviosa (Muzzarelli, 2009).

Fibra de abacá

Son fibras naturales provenientes de la planta de abacá (*musa textilis*), sus propiedades aportan refuerzo a los materiales compuestos y presentan la ventaja de ser económicas en comparación con sus homólogos sintéticos. Las fibras de abacá son consideradas como un material compuesto debido a que se alojan en la hemicelulosa y lignina (Delicano, 2018).

La fibra de abacá presenta estabilidad térmica a temperaturas inferiores a los 250°C, su índice de cristalinidad es superior al 65%, sus propiedades mecánicas presentan alta resistencia a la tracción con valores que varían entre 511-1051 MPa y el módulo de Young oscila entre 13.5-29.8 GPa (Souza & D'Almeida, 2014).

Muchos materiales han sido reforzados usando fibra de abacá por las características y beneficios que aporta. También, su contenido estructural de 60% celulosa, 21% hemicelulosa, un 12-16% de lignina y un 1% de pectina lo idealizan como fuente de celulosa (Barba et al., 2020).

Genipín

El genipín es una aglicona del genipósido que presenta gran actividad química ante la exposición de compuestos ricos en grupos amino primarios, aminoácidos, glucosamina, proteínas, enzimas, colágeno y quitosano. En presencia de oxígeno, el genipín reacciona formando tonalidades como verde, negro o azul intenso (S. Wu & Horn, 2010).

Este reactivo puede obtenerse a partir del fruto de la *Gardenia jasminoides* o la *Genipa americana* y es utilizado en medicina por su potencial contra el factor promotor de tumores (Koo et al., 2006). El genipín es un excelente agente biológico que sirve para entrecruzamiento natural con proteínas, colágeno, gelatina y quitosano para fabricación de materiales biológicos como huesos artificiales y tejidos para heridas, también es utilizado como agente regulador para la administración de drogas, como materia prima para la fabricación de pigmento azul de gardenia y como líquido de tatuaje (Neri-Numa et al., 2017).

Existen patentes que especifican la forma en la que se puede obtener el genipín de los frutos de *Genipa americana* y de la gardenia. A partir de la gardenia amarilla se puede extraer genipín mediante el proceso especificado en (Zhu et al., 2014). De la *Genipa americana* mediante la explicación estipulada por (S. Wu & Horn, 2010).

Entrecruzamiento (Crosslinking)

Los agentes de entrecruzamiento son utilizados para la fabricación de biopolímeros con capacidades únicas de encapsulamiento celular, liberación de medicamentos de forma controlada, lentes de contacto y separación de proteínas debido a las propiedades que aporta en combinación con varias bases biopoliméricas. Las reacciones de entrecruzamiento pueden clasificarse en entrecruzamiento por reacción química de grupos complementarios como aldehídos, reacciones de adición y condensación, entrecruzamiento por irradiación de alta energía y utilizando enzimas (Hennink & Van Nostrum, 2012).

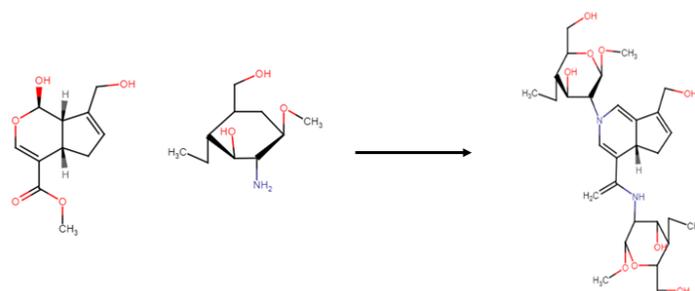
Dichas reacciones ocurren con grupos hidroxilo o aminas y ácidos carboxílicos o sus derivados. Se producen poliésteres, poliamidas o hidrogeles. Existen muchos reactivos utilizados en este tipo de reacciones uno de ellos es el N,N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida y el genipín (Hennink & Van Nostrum, 2012).

Biopolímero entrecruzado

Los hidrogeles que son entrecruzados con genipín presentan mejor adhesión celular, incrementa la densidad de entrecruzamiento y el módulo de almacenamiento. La degradación es más prolongada en comparación con la membrana de quitosano puro y su resistencia mecánica aumenta (Yu et al., 2021).

Figura 3

Mecanismo de reacción entre genipín y quitosano



Nota. En la imagen se presenta el mecanismo de reacción entre genipín y quitosano. Tomado de *Genipin-cross-linked hydrogels based on biomaterials for drug delivery: a review* (p. 1586), por (Yu et al., 2021).

Dentro de la reacción entre el genipín y el quitosano (Figura 3), el primero actúa como un dialdehído y el mecanismo es similar al que ocurre entre el quitosano y el glutaraldehído. La razón por la que no se recomienda el empleo de glutaraldehído es por su citotoxicidad (Yu et al., 2021).

Diseño experimental

Dentro de la investigación, el diseño experimental o diseño de experimentos cumple un rol fundamental en la obtención de información relevante que permita el desarrollo de productos o procedimientos innovadores, además de facilitar la toma de decisiones para mejorar aspectos críticos en productos (Eriksson et al., 2001).

El diseño experimental dentro de la investigación provee una poderosa herramienta para determinar características o interacciones de las variables que tienen incidencia en los resultados esperados. La aplicación del diseño de experimentos no solamente aplica a investigación, a continuación, se mencionan algunos campos donde es muy útil el diseño experimental:

- Industria química.
- Industria de polímeros.
- Industria de manufactura de vehículos.
- Industria farmacéutica.
- Industria de plásticos y pinturas
- Industria de telecomunicaciones

Mediante la ejecución de experimentos se puede obtener datos que generen conocimiento, esto representa el punto de partida para la aplicación del método científico, ya que las condiciones que interactúan pueden generar cambios, estos cambios deben ser cuantificados o cualificados para determinar que propiedades tiene el resultado (Gutierrez & de la Vara, 2008).

Para la aplicación de la metodología que mejor se ajuste a la investigación es necesario determinar las variables o factores de estudio que pudieran tener mayor impacto en el resultado deseado. A su vez, cada factor cuenta con niveles de estudio que serán determinados por el investigador.

La combinación entre niveles de estudio de cada factor se denomina tratamiento, donde cada tratamiento dará como resultado un valor denominado respuesta experimental (Montgomery, 2004).

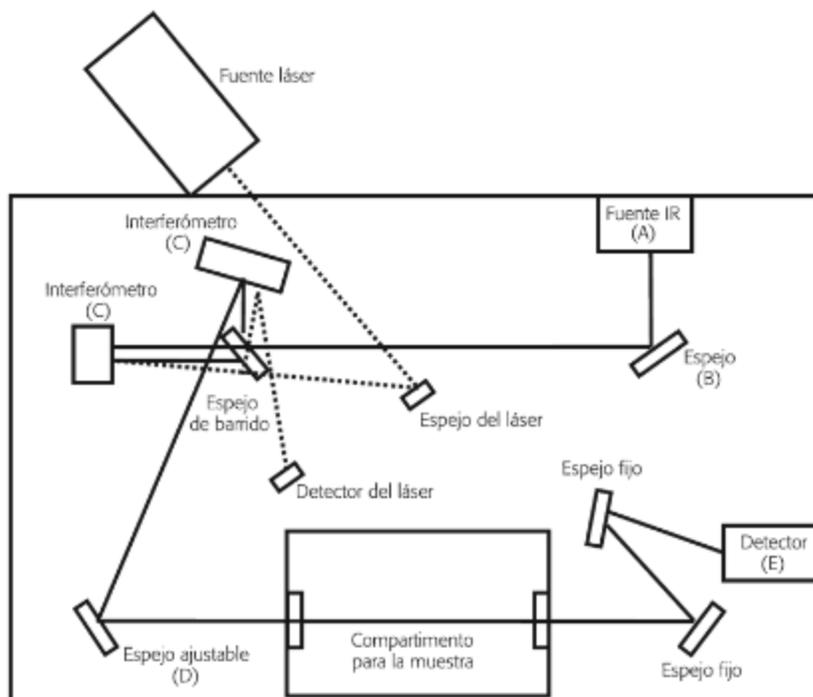
Análisis físicos y químicos

FTIR

Es el equipo que consta de una fuente de radiación infrarroja que, luego de la colimación es direccionada mediante el uso de espejos al interferómetro. El mecanismo de funcionamiento del equipo se muestra en la Figura 4.

Figura 4

Esquema del equipo FTIR



Nota. En la imagen se presenta un esquema gráfico del funcionamiento básico del FTIR.

Tomado de *Análisis Instrumental* (p. 79), por (Sierra et al., 2009).

En la Figura 4 se detalla el principio con el cual se basan los espectrómetros multiplex o de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) es: (A) fuente de infrarrojos, (B) espejo, (C) interferómetro. El análisis FTIR se basa en mostrar mediante un interferograma la cantidad de radiación absorbida por las muestras de interés (Sierra et al., 2009).

Dicho equipo se utiliza debido a la capacidad de analizar los enlaces de los átomos mediante vibración, este efecto se obtiene por la radiación del infrarrojo que posee una frecuencia oscilante entre 20 y 14500 cm^{-1} (Sierra et al., 2009).

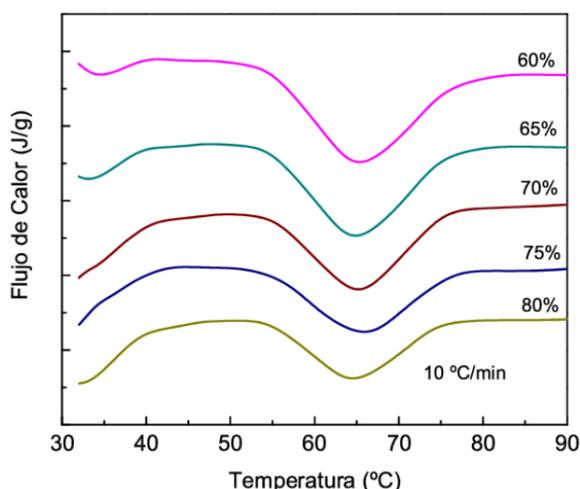
DSC

El análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC) tiene como fin, mediante el uso de variaciones térmicas, recopilar los cambios de entalpia que sufre la muestra y el material de referencia durante el análisis (Sandoval et al., 2004).

Una vez realizado el análisis, los resultados de la entalpía mostrada en función de la temperatura (Dh/dt) se muestran en un termograma y son suficientes para determinar los valores de entalpías de reacción o transición (Sandoval et al., 2004).

Figura 5

Curva DSC del almidón



Nota. En la imagen se presenta un termograma que se obtiene en un DSC. Tomado de *Papel del agua en la gelatinización del almidón de maíz: Estudio por calorimetría diferencial de barrido* (p. 135), por (Pineda et al., 2010).

En la Figura 5 se visualiza que a una temperatura aproximada de 65°C se produce un pico endotérmico con el cual se puede obtener la entalpía de transición que servirá para interpretación de los cambios que sufre la muestra (Pineda et al., 2010).

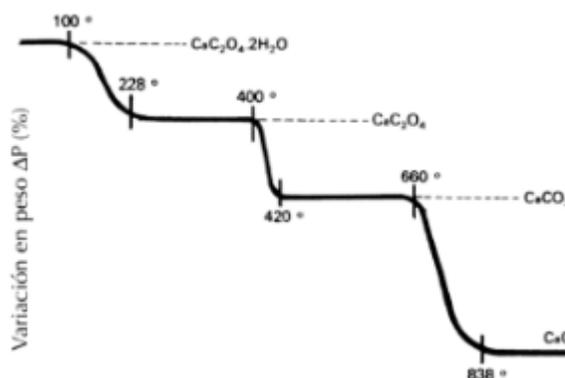
TGA

El análisis termogravimétrico (TGA) es aquel que mide el cambio del peso de una muestra expuesta al calor de forma continua. Permite observar en los distintos puntos térmicos la cantidad de masa perdida en forma de gas (Matteini & Moles, 2001).

Puede mostrar los cambios ocurridos a una muestra específica en función de la temperatura y tiempo en una gráfica que recibe el nombre de termograma o curva de descomposición térmica (Matteini & Moles, 2001).

Figura 6

Termograma del oxalato de calcio dihidratado



Nota. Termograma del oxalato de calcio dihidratado. Tomado de *Ciencia y restauración: método de investigación* (p. 151), por (Matteini & Moles, 2001).

En la Figura 6 se muestran los distintos descensos que sufre el oxalato de calcio dihidratado: primero se evapora el agua a los 100°C, segundo el CO a los 400°C y por último el CO₂ a los 600°C (Matteini & Moles, 2001).

Estado del arte

En Ecuador no se han desarrollado estudios relacionados con el tema de esta investigación, esto se debe a que los hidrolizados de proteína animal son utilizados principalmente en la producción de alimento para animales domésticos y de granja. En otros países se han realizado investigaciones afines, las cuales se describen a continuación:

“Fabricación, propiedades y bioaplicaciones de películas compuestas de celulosa/colágeno hidrolizado”, este estudio describe la preparación de películas

biodegradables de colágeno hidrolizado reforzados con celulosa regenerada para mejorar las características comunes de las películas de colágeno hidrolizado, proveyendo una alternativa sencilla y poco contaminante para la elaboración de empaques (Pei et al., 2013).

“Hacia una descarga cero residuos de cuero que contienen cromo a través de una hidrólisis alcalina mejorada”, en esta investigación se investiga acerca del método más factible y menos contaminante para producir hidrolizado de proteína a partir de desechos de la curtiembre al cromo, realizando una comparación entre dificultad, tiempo requerido y rendimiento entre los procesos de hidrólisis enzimática e hidrólisis química (Mu et al., 2003).

“Películas mezcladas de quitosano-gelatina reticuladas con genipín reforzadas con óxido de grafeno”, se describe el proceso de síntesis y caracterización de películas biocompuestas entre quitosano y gelatina, entrecruzadas con genipín y reforzadas con óxido de grafeno. Las mejoras aportadas por la adición de óxido de grafeno son estudiadas mediante espectrometría de infrarrojos con transformada de Fourier (FTIR) y difracción de rayos X (XDR) (Vlasceanu et al., 2020).

“Preparación y desempeño de nuevos materiales poliméricos biodegradables basados en proteínas hidrolizadas para aplicación agrícola”, en esta investigación se desarrollan materiales poliméricos biodegradables basados en proteína hidrolizada proveniente de los desechos de la industria del cuero, los materiales desarrollados consisten en acolchados para plantaciones en invernaderos (Sartore et al., 2013).

Capítulo III

Metodología

En este apartado se desarrolla la descripción de equipos, materiales, reactivos y procedimientos que se ejecutan en favor del desarrollo de este trabajo, tanto para la extracción del genipín, como para la transformación del sebo de la curtiembre en hidrolizado de proteína. Estas actividades se enlistan a continuación, culminando con la elaboración de la biomembrana compuesta o composite y cada uno de los ensayos y análisis efectuados.

Equipos, materiales y reactivos

Equipos

- Balanza analítica digital.
- Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) Mettler Toledo DSC 1 STAR System.
- Espectrómetro de infrarrojos por transformada de Fourier (FT-IR ATR) PerkinElmer, modelo Frontier.
- Analizador termogravimétrico (TGA) PerkinElmer, modelo Pyris 1 TGA.
- Agitador magnético con calefacción Boeco, modelo MSH 420.
- Estufa de secado.
- PH metro de mesa Boeco, modelo CT 676.
- Espectrofotómetro UV-visible Boeco, modelo S 220.
- Rotavapor Boeco, modelo RVO 400 SD

Materiales

- Pipetas graduadas de 1 ml, 5 ml y 10 ml
- Vasos de precipitación de 100 ml, 600 ml y 2 l.
- Balones aforados de 100 ml y 250 ml.
- Embudos de vidrio.
- Embudo Buchner.

- Kitasato de 500 ml.
- Papel filtro.
- Soporte universal.
- Equipo Soxhlet.
- Termómetro de mercurio.

Reactivos

- Acetato de Etilo.
- Dietiléter.
- Acetona.
- Hexano.
- Metanol.
- Ácido acético.
- Ácido fosfórico.
- Ácido clorhídrico.
- Hidróxido de sodio.
- Cloruro de amonio.
- Agua destilada.

Obtención de la materia prima

La materia prima consiste en el residuo de sebo de la curtiembre sin grasa, obtenido del proceso de descarnado de las pieles de vacuno proporcionado por la empresa Curtiduría Tungurahua, dedicada a la fabricación de cuero por medio del proceso de curtiembre al cromo.

Para la extracción del agente entrecruzante (genipín) se utilizan los frutos del árbol Jagua o *Genipa americana* y para la obtención de quitosano se utilizan los caparazones de camarón sin cabeza ni patas. Las fibras de abacá fueron obtenidas del árbol de la planta *Musa textilis*.

Proceso de hidrólisis del sebo

El primer procedimiento para acondicionar el sebo recolectado de los desechos de la curtiembre es lavarlo con agua por varias veces, para eliminar componentes indeseados como tierra o pedazos de plástico que pudieran estar presentes. Posteriormente, se realiza una precocción a temperatura de 80 °C por 45 minutos para ablandar la materia prima y retirar los remanentes de grasa existente, una vez transcurrido el tiempo, se deja enfriar y se filtra toda el agua, por último, se lava nuevamente el sebo con agua limpia hasta que el agua de lavado sea clara como se muestra en la Figura 7.

Figura 7

Acondicionamiento del sebo



Nota. Lavado del sebo con agua para retirar impurezas.

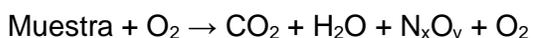
La hidrólisis se lleva a cabo utilizando como base hidróxido de sodio en proporción 7:100 respecto a la cantidad de sebo, además, es necesario agregar agua destilada hasta que el sebo quede cubierto. Esta mezcla fue colocada en un vaso de precipitados de 2 L, utilizando un agitador magnético para propiciar el correcto mezclado a una temperatura de 90 °C por 3 horas. Una vez transcurrido el tiempo, el producto debe filtrarse en caliente y al vacío para obtener un líquido marrón - amarillento viscoso, los lodos obtenidos del fondo contienen las

impurezas. Como último paso del proceso de hidrólisis, se mide el pH del hidrolizado y se neutraliza con una solución de ácido fosfórico 0.5 M (Mu et al., 2003).

Contenido de proteínas del hidrolizado

El método Dumas, o método de combustión de nitrógeno es una alternativa al método de determinación de proteínas Kjeldahl. La base del método Dumas es la conversión de todas las formas de nitrógeno en la muestra a óxidos de nitrógeno mediante combustión a 800 – 1000 °C y luego la reducción a nitrógeno gaseoso para efectuar las mediciones mediante un detector de conductividad térmica (Jung et al., 2003).

La reacción que describe el proceso de combustión es:



Luego del proceso de combustión se lleva a cabo la reducción y separación de los gases, estos son recogidos y llevados a un horno de alta temperatura donde se eliminan todos los gases exceptuando el nitrógeno y óxidos de nitrógeno, finalmente los óxidos de nitrógeno son reducidos a gas nitrógeno mediante un tubo catalizador de cobre (Saint-Denis & Goupy, 2004).

Reacción de reducción y separación:



El porcentaje de nitrógeno total de la muestra es determinado mediante la señal medida por el detector de conductividad térmica, para determinar el porcentaje de proteínas se utilizan factores de multiplicación según el tipo de muestra introducida en el aparato (Jung et al., 2003).

El análisis de proteínas fue realizado en las muestras de sebo secadas por 24 horas a 45 °C y de las muestras de hidrolizado de proteína para determinar la cantidad total de nitrógeno en ambas.

Extracción de genipín

Para la extracción del genipín a partir de los frutos de la *Genipa americana* se siguieron dos métodos presentados en la patente US20130115252A1, con la finalidad de seleccionar el que tenga mejor rendimiento en la extracción de genipín, permita la reutilización de los solventes utilizados y requiera menos tiempo. Dichos métodos se describen a continuación:

Método uno

Las frutas de *Genipa americana* se pelaron y cortaron en trozos pequeños. A continuación, fueron pesados 866 g de fruta y se licuaron con 1300 g de agua destilada hasta obtener un pure. El pure se dejó reposar por 15 minutos y se separó el residuo sólido del líquido mediante filtración, en este punto fueron añadidos 1212.4 g de agua destilada al residuo sólido para una segunda extracción por el tiempo determinado. El pH del filtrado líquido se ajustó a <4 usando ácido cítrico, para luego ser concentrado entre un 25-55% (w/w) de contenido sólido. El extracto acuoso concentrado que contiene genipín fue extraído con dietiléter en relación 1:1 mediante vigorosa agitación, la mezcla fue dejada en reposo hasta que pudo observarse la separación de fases: la capa superior con color amarillento, mientras que la capa inferior presentó color azul intenso. Se recolectó la capa superior y el proceso se realizó por duplicado. El último paso consiste en concentrar el extracto rico en genipín usando un rotavapor, el producto será un polvo blanco – amarillento con alto contenido de genipín.

Método dos

El segundo método guarda similitudes con el primero, tomando en cuenta que las frutas peladas y cortadas de *Genipa americana* pueden ser procesadas con agua o solvente polar en relación 1:1.5. El solvente utilizado en este método fue metanol, con índice de polaridad de 5.1. Una vez mezclado el solvente con la fruta pulverizada mediante vigorosa agitación, se dejó reposar por 30 minutos a temperatura ambiente, una vez transcurrido el tiempo de extracción, se recolectó el solvente utilizado y se repitió el proceso. El pH de la solución se ajustó entre 3.8

– 4 usando ácido acético. El proceso de concentración del extracto fue efectuado en rotavapor de acuerdo con las condiciones de temperatura y presión de vacío dadas por el fabricante del equipo. La concentración del extracto se detuvo cuando el contenido de sólidos se encontraba entre 40 – 70% (w/w). A continuación, fue efectuada una segunda extracción con solvente no polar en relación 1:1, dicho solvente debe cumplir dos requisitos: índice de polaridad entre 0 – 5 y solubilidad en agua menor al 30%. El solvente utilizado para este efecto fue hexano, con índice de polaridad de 0.1 y solubilidad en agua menor al 30%, este solvente fue mezclado con el extracto mediante vigorosa agitación, luego se dejó reposar hasta que la separación de fases fue evidente, entonces se recogió el solvente y el proceso fue repetido 3 veces. Por último, el nuevo extracto rico en genipín fue concentrado en rotavapor y el solvente recolectado puede usarse nuevamente. El producto consiste en un polvo blanco – amarillento rico en genipín.

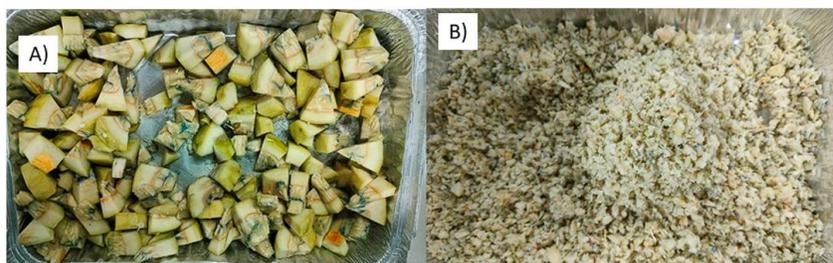
Método propuesto

El proceso de extracción de genipín a partir de los frutos del árbol *Genipa americana* fue desarrollado por el grupo de trabajo, tomando en cuenta algunas consideraciones metodológicas de (S. Wu & Horn, 2010). En la patente se proponen varios métodos para extraer genipín, sin embargo, mediante la experimentación se determinó que no eran viables para la investigación por falta de medios y baja efectividad, en consecuencia, se propone el siguiente método de extracción de genipín a partir del fruto de la *Genipa americana*.

Las frutas seleccionadas fueron pesadas en balanza analítica y se retiró su corteza, a continuación, se cortaron en pedazos más pequeños para luego ser trituradas y pesadas nuevamente como se muestra en la Figura 8. La fruta triturada se colocó en bandejas de aluminio dentro de una estufa de secado a 45 °C por 24 horas.

Figura 8

Tratamiento de la fruta de la Genipa americana



Nota. A) fruta picada. B) fruta triturada.

Cuando el fruto triturado estuvo completamente seco, se utilizó el equipo Soxhlet que consiste en un tubo refrigerante de 300 mm, un extractor Soxhlet de 250 ml y un balón de 250 ml. La materia prima fue ubicada dentro de dedales de celulosa y luego se colocó en el extractor. El solvente usado debe tener un índice de polaridad de entre 0 y 5, por esto se ha utilizado el acetato de etilo con índice de polaridad de 4,4. La temperatura de extracción no debe superar los 90 °C y el tiempo de extracción por carga es de 1 hora y 20 minutos tal como se ilustra en la Figura 9.

Figura 9

Proceso de extracción del genipín



Nota. Extracción del genipín por medio del equipo Soxhlet.

Una vez que se han extraído los genipósidos de la fruta, el solvente cargado con el agente entrecruzante se llevó a rotavapor, en este punto el solvente utilizado fue recuperado y el producto obtenido fue un extracto rico en genipín. Para purificar el genipín se utilizaron dos solventes: acetona y hexano.

En primer lugar, se añadieron unas gotas de acetona y la mezcla fue sometida a vigorosa agitación para inducir la precipitación del genipín, a continuación, se agrega hexano en relación 1:1 y la mezcla fue filtrada mediante vacío para retirar las resinas excedentes. El producto filtrado se separó cuidadosamente de la mezcla y se secó en estufa a 45 °C. Este proceso fue repetido entre 2 y 3 veces hasta obtener un polvo blanco ligeramente amarillento.

Obtención de Quitosano

El quitosano utilizado en la investigación fue obtenido mediante el método indirecto presentado por (Lalaleo, 2010), en el método se detallan los procesos a seguir para obtener quitosano a partir de caparazones de camarón.

Los caparazones de camarón deben estar secos y sin cola ni patas. El procedimiento comienza con la cocción de los caparazones triturados con una solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 0.5% (w/v), en relación 2:3 por 30 minutos con agitación constante a 80 °C para desproteinizar la materia prima.

El precipitado del procedimiento anterior fue lavado con abundante agua y luego se sometió a un nuevo proceso de cocción con una solución de NaOH al 3% (w/v) por 10 minutos con agitación constante a 80 °C. Este proceso fue realizado por triplicado y el filtrado resultante fue lavado con abundante agua por varias veces hasta obtener un pH cercano a 7.

La desmineralización del precipitado fue llevada a cabo con una solución de ácido clorhídrico (HCl) 2M a temperatura ambiente por una hora, seguido fue descartado el sobrenadante y el sólido resultante se lavó varias veces hasta obtener pH cercano a 7. El

sólido obtenido consiste principalmente en quitina, esta fue colocada en bandejas y luego fue secada a 50 °C por 6 horas.

El proceso de desacetilación se llevó a efecto con una solución de NaOH al 50% (w/v) a 100 °C en relación 1:2 (w/v) por lapso de 4 horas. Una vez más, el sobrenadante fue descartado y el sólido remanente se lavó con abundante agua hasta obtener un valor de pH cercano a la neutralidad.

Diseño experimental

Para determinar la interacción de cada componente de la bio-membrana, se utiliza el diseño experimental multifactorial de 3 factores con 2 niveles de estudio cada uno (Tabla 2) donde se muestran las variaciones en las cantidades de cada componente.

Tabla 2

Factores y niveles de estudio

Factores	Niveles de estudio
A: Cantidad de hidrolizado (HFW)	1 %wt. 3 %wt.
B: Cantidad de quitosano (CH)	1 %wt. 3 %wt.
C: Cantidad de genipín (GEN)	0.6 %wt. 1 %wt.

En la Tabla 3 a continuación, se muestra el diseño adoptado para la investigación. Para este caso concreto no se utilizaron experimentos de control únicamente con proteína, ya que

no es posible hacer las películas sin entrecruzante ni quitosano. Para simplificar los nombres se utilizan las siglas HFW para el hidrolizado de proteína, CH para quitosano y GEN para genipín.

Tabla 3

Tratamientos realizados

Tratamientos	Código	% wt. HFW	% wt. CH	% wt. GEN	Y
1	A	1	1	0.6	
2	B	3	3	1	
3	C	1	1	1	
4	D	3	3	0.6	
5	E	1	3	0.6	
6	F	3	1	1	
7	G	1	3	1	
8	H	3	1	0.6	

Para realizar el análisis estadístico y pruebas correspondientes se utilizó el software Minitab, teniendo en cuenta la prueba de Tuckey para la determinación de las diferencias significativas en propiedad de mayor impacto.

Preparación de las bio-membranas

Para elaborar la solución de las bio-membranas se utilizó como base una solución de ácido acético al 1% V/V, con el fin de promover la solubilización del quitosano, además de mantener el pH en niveles adecuados para propiciar la reacción de entrecruzamiento (Mi et al., 2005).

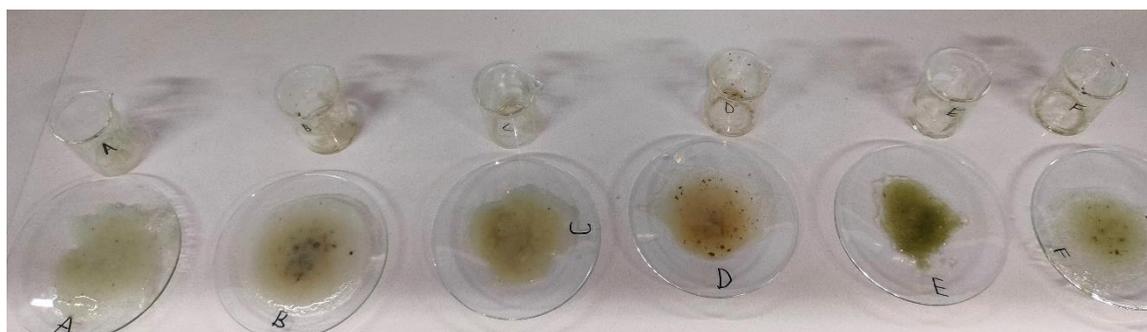
El volumen total escogido para las pruebas fue de 50 ml. Se empezó con 40 ml de solución de ácido acético 1%, luego se añadió la cantidad correspondiente de quitosano y luego fue calentada a una temperatura entre 40 – 50 °C hasta que el quitosano se haya disuelto completamente y se forme una solución viscosa transparente (Vlasceanu et al., 2020).

En el restante de volumen se preparó la solución de hidrolizado de proteína colocando la cantidad de hidrolizado adecuada para la mezcla, a esta solución se agregó el genipín de acuerdo con la proporción y la mezcla fue sometida a agitación hasta visualizar una mezcla correcta, de inmediato se añadió esta solución a la solución de quitosano y se sometió a vigorosa agitación a temperatura ambiente por 20 minutos (Sartore et al., 2013).

Para las bio-membranas que contienen fibras de abacá, es necesario añadir las fibras junto con la solución de hidrolizado de proteína y genipín. Una vez transcurrido el tiempo de reacción, las soluciones formadoras se colocaron en un vidrio reloj y se dejaron secar a 25 °C por 24 horas como muestra la Figura 10.

Figura 10

Soluciones formadoras de bio-membranas



Nota. En la figura se muestran algunas pruebas de soluciones formadoras.

Pruebas fisicoquímicas

Solubilidad

En la síntesis de la bio-membrana desarrollada en este trabajo se buscan características de biodegradabilidad y bajo impacto ambiental, debido a que se trata de un biopolímero a base de proteína. Entre las características principales proporcionadas por la heterogeneidad de la estructura polimérica se encuentran: estabilidad térmica y comportamiento hidrofílico (Havstad, 2020).

La metodología adoptada para determinar la solubilidad de las bio-membranas fue desarrollada por (J. Wu et al., 2013).

Con el propósito de mantener una humedad relativa del 0% en las películas, fueron sometidas a secado en estufa a 45 °C por 48 horas antes de realizar la prueba de solubilidad en agua. Las dimensiones de las bio-membranas fueron 20 mm x 20 mm, estos cuadrados se colocan en 5 ml de agua destilada a 25 °C en un baño de agua con agitación a 50 rpm por 5 minutos. Transcurrido el tiempo, se retiró la bio-membrana del agua cuidadosamente y se colocó en estufa de secado a 100 °C hasta obtener un peso constante. Todas las pruebas fueron llevadas a cabo por triplicado.

La solubilidad en agua de las muestras fue calculada mediante la ecuación:

$$1. W_s = \frac{(W_0 - W_1)}{W_0} * 100$$

Donde:

- W_0 : peso de la bio-membrana seca antes de la prueba.
- W_1 : peso de la bio-membrana seca después de la prueba.

Análisis térmicos

Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico se realizó con el propósito de determinar la pérdida de peso de la bio-membrana de acuerdo con los cambios de temperatura. Las pruebas fueron llevadas a cabo en el equipo TGA PerkinElmer Pyris 1, utilizando el modelo propuesto por (Giteru et al., 2019). Tomando muestras de 10 mg con una curva de temperatura desde 25 hasta 750 °C con tasa de calentamiento de 10 °C/min y un caudal de nitrógeno de 20 ml/min.

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

El ensayo de calorimetría diferencial de barrido fue realizado conforme a la norma ASTM D3418, según la descripción de Shen y Kamdem (Shen & Kamdem, 2015).

Se tomaron muestras de 5 mg con 0% de humedad relativa y se colocan en el equipo DSC Mettler Toledo Star System. Primero se mantiene el equipo a temperatura estable por 2 minutos antes de calentar la muestra a una tasa de 5 °C/min con un régimen de temperatura de 25 – 225 °C, con caudal de nitrógeno de 20 ml/min.

Características estructurales

Espectrometría de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR)

Para este análisis se utilizó el equipo ATR-FTIR PerkinElmer Frontier con el fin de valorar las interacciones de los componentes: proteína hidrolizada, quitosano y agente entrecruzante, además de verificar la efectividad del método en la extracción del genipín (Pei et al., 2013).

Las muestras de las bio-membranas fueron colocadas en pedazos secados previamente a temperatura ambiente. Cada espectro obtenido fue evaluado en la región de 4000 a 400 cm^{-1} en condiciones ambientales.

Capítulo IV

Análisis de resultados

Proceso de hidrolisis del sebo

El acondicionamiento e hidrolisis del sebo de la curtiembre fue realizado con el propósito de obtener un producto con mayor contenido de proteína que la materia prima para facilitar su solubilidad, entre otras propiedades que mejoren el proceso reactivo. Es necesario indicar que las muestras de sebo proporcionadas contenían grasa en muy baja cantidad, esto se debe a que en la empresa se realiza un proceso de pre – descarnado para utilizar la grasa animal.

La revisión bibliográfica muestra que el sebo o residuo de descarnado contiene 78.9% (± 2.5) de humedad, 1.6% (± 0.4) de grasa y el contenido de proteínas es 19.7% (± 2.8) (Anzani et al., 2018).

Respecto al rendimiento del proceso, se realizaron pruebas por triplicado para determinar la cantidad de hidrolizado de proteína que puede obtenerse del sebo.

Tabla 4

Cantidad de hidrolizado obtenido

Muestra (g)	Sebo ¹ (g)	Grasa (g)	HFW (g)	% Sebo	% HFW ²
1976.38	473.95	23.05	264.32	23.98	44.23
2124.75	468.45	23.0	259.15	22.05	44.68
2259.73	564.93	22.5	299.30	24.99	47.01

Nota. ¹ Peso sin agua. ² porcentaje respecto a la masa de sebo sin agua.

Los resultados obtenidos en la hidrólisis (Tabla 4) muestran un rendimiento promedio del 45.3% tomando como base el peso del sebo sin agua. Cabe resaltar que se realizó el mismo tratamiento a todas las muestras, acorde con la metodología correspondiente al proceso de hidrólisis escogido. El agua obtenida en el acondicionamiento del sebo contiene en gran parte las sales usadas para la curtiembre y puede ser tratada junto con aguas residuales.

Contenido de proteínas del hidrolizado

Para determinar la cantidad de proteína que contiene el residuo del sebo y el hidrolizado, se utiliza el método Dumas, con un factor de conversión de proteínas de 6.25, obteniéndose los resultados que se muestran en la Tabla 5:

Tabla 5

Contenido de proteínas en las muestras

Muestra	% N	% proteínas
Sebo sin tratamiento	4.124	25.776
Hidrolizado	10.212	63.824

Los resultados obtenidos en el proceso de hidrólisis se encuentran acorde a los resultados de investigaciones previas, donde se indica que el porcentaje de nitrógeno del hidrolizado de proteína del sebo de la curtiembre contiene 8.7% (± 1.9) de nitrógeno (Anzani et al., 2018).

En el proceso de hidrólisis utilizado, se demuestra que el porcentaje de proteínas se incrementa del 25.77% a 63.82%.

Extracción de genipín

En este proceso se consideraron aspectos como la complejidad de los métodos efectuados, cantidad de solventes utilizados y rendimiento en la extracción, haciendo énfasis en que el método propuesto busca reutilizar todos los solventes y obtener la mayor cantidad posible de genipín.

Cada experimento fue llevado a cabo en las mismas condiciones climáticas con el propósito de limitar el error que pudiera producirse respecto al rendimiento en la extracción de genipín

Los resultados obtenidos de cada método se describen a continuación:

- El primer método no representa complejidad elevada, sin embargo, no cumple con el requisito de poder recuperar correctamente el solvente utilizado, esta limitación es atribuida a la alta volatilidad del dietiléter, ya que, aun utilizando valores bajos de temperatura y presión en rotavapor para evitar la pérdida de solvente, no se logró recuperar el mismo en cantidades favorables. En contraste, el rendimiento en la extracción de genipín mostró ser favorable, obteniéndose cantidades cercanas a las mencionadas por la patente.
- Siguiendo la línea de las consideraciones mencionadas, el segundo método representa poca complejidad y el solvente puede ser reutilizado, no obstante, la cantidad de genipín obtenida es muy baja. El método fue replicado tres veces y no se pudo obtener el producto deseado.

El método de extracción propuesto presenta las siguientes ventajas: buena recuperación de los solventes utilizados y rendimiento aceptable en la extracción de genipín.

El punto clave en este método de extracción reside en deshidratar la materia prima, al no contener agua en la matriz, permite el contacto directo entre los genipósidos y el solvente no

polar. Esto ayuda a la recuperación de las resinas que contienen genipín, que posterior a ser concentradas en rotavapor, son purificadas con una cantidad limitada de hexano y acetona.

Los resultados de porcentaje en peso de la masa de agua contenida en los frutos de la genipa americana se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6

Contenido de humedad de los frutos de la Genipa americana

Fruta sin cascara (g)	Fruta seca (g)	% Agua
276.29	64.44	76.67
246.03	60.32	75.48
246.29	60.47	75.45

Los solventes usados pueden recuperarse utilizando rotavapor, sin embargo, la complejidad de esta metodología es más elevada que los métodos de la patente, ya que requiere de varias fases y el tiempo requerido ronda las 4 horas sin contar el tiempo necesario para que la materia prima esté seca.

A continuación, en la Tabla 7 se muestran los resultados del rendimiento en la extracción.

Tabla 7

Contenido de genipín extraído

Fruta con cascara (g)	Fruta deshidratada (g)	% Genipín
307.97	64.44	0.2229
266.91	60.32	0.2505

Fruta con cascara (g)	Fruta deshidratada (g)	% Genipín
272.98	60.47	0.2179

El rendimiento total de las pruebas realizadas se aproxima a 0.23% en peso respecto a la masa total de las frutas utilizadas para la extracción de genipín, este resultado va acorde con lo mencionado en la patente (S. Wu & Horn, 2010).

Obtención de quitosano

El proceso utilizado para la obtención de quitosano a partir de caparzones de camarón mostró resultados favorables en la etapa de desacetilación, esto puede evidenciarse mediante el análisis del espectro obtenido por FTIR que se explica en el apartado correspondiente del capítulo 4 de esta investigación

Preparación de las bio-membranas

En la fase temprana de la investigación se realizaron pruebas para obtener bio-membranas mezclando hidrolizado de proteína y genipín. Cuando la reacción empezó se observaba un color azulado característico del entrecruzamiento del genipín y los aminoácidos, sin embargo, luego del tiempo de secado la bio-membrana no presentaba buenas características físicas.

Posteriormente se añadió quitosano en baja proporción para verificar si se mejoraban las características de la bio-membrana, en este caso se evidencio más maleabilidad en las bio-membranas, aunque la resistencia al estiramiento no era la deseada.

Una vez se determinaron las proporciones adecuadas de los reactivos, se llevaron a cabo 8 experimentos por triplicado para visualizar que combinación presentaba mejores características a simple vista, estos efectos se muestran a continuación en la Tabla 8:

Tabla 8

Características de las soluciones formadoras de bio-membranas

Nombre	Disolución de reactivos	Cantidad de burbujas	Viscosidad
A	Buena	Muy alta	Alta
B	Muy mala	Muy alta	Media
C	Buena	Muy alta	Media
D	Mala	Media	Media
E	Buena	Baja	Alta
F	Media	Muy baja	Alta
G	Buena	Baja	Media
H	Muy buena	Muy baja	Media

Las características cualitativas presentadas en la tabla fueron observadas con el propósito de evaluar la facilidad de colocación de las soluciones formadoras en un molde. Varias muestras mostraban propiedades no deseadas como: demasiada cantidad de burbujas y viscosidad muy elevada y baja disolución de los reactivos.

Este fue un primer paso para seleccionar las combinaciones que exhibían mejores cualidades para elaborar bio-membranas, posteriormente se analizaron las características del entrecruzamiento y análisis térmico a estas combinaciones.

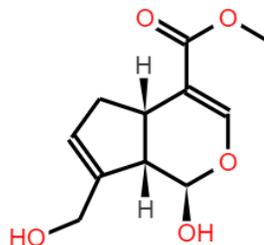
Análisis de FTIR

FTIR del hidrolizado de proteína

El análisis de espectrometría de infrarrojos con transformada de Fourier de la Figura 12 permite identificar la presencia de aminoácidos en la muestra de hidrolizado de proteína. En la

Figura 12

Estructura química del genipín

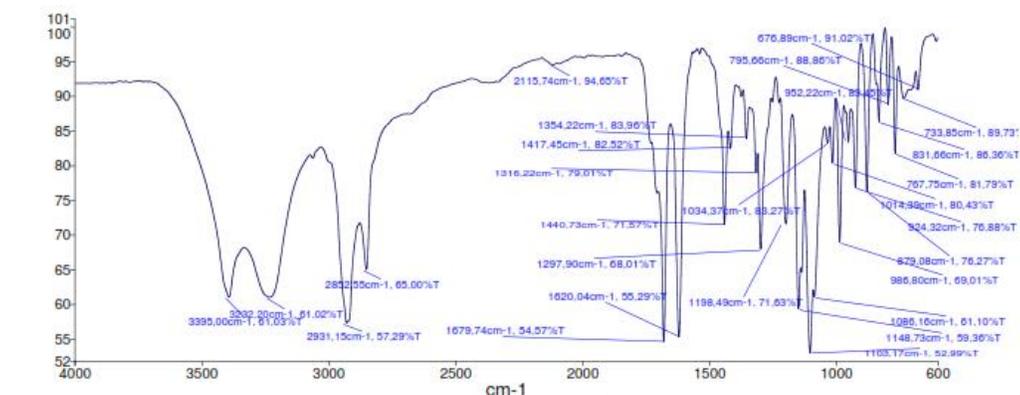


El espectro IR de la Figura 13 pone en evidencia que: Los picos en la longitud de onda de 3395 y 3232 cm^{-1} muestran el estiramiento del enlace O-H, a 2931 cm^{-1} se presenta el estiramiento de los enlaces C-H, mientras que, en 1679, 1620 y 1440 cm^{-1} aparecen las vibraciones de tensión de los enlaces C=O, C=C y del anillo aromático, respectivamente. Por último, en la longitud de onda 1297 cm^{-1} se tiene la vibración asimétrica del enlace C-O del éter y a 1103 cm^{-1} aparece la vibración de tensión simétrica y asimétrica del enlace C-O del éster.

Acorde a los datos reportados por (Álvarez, 2017), los datos obtenidos por el análisis FTIR realizados en la presente investigación denotan la presencia de genipín.

Figura 13

Espectro IR del genipín extraído



FTIR del quitosano

El estudio del espectro FTIR de la muestra de quitosano (Figura 14) las interacciones que presentan los grupos funcionales de esta molécula con la radiación electromagnética. La banda fuerte en la región $3359 - 3296 \text{ cm}^{-1}$ corresponde al estiramiento de los enlaces N-H y O-H.

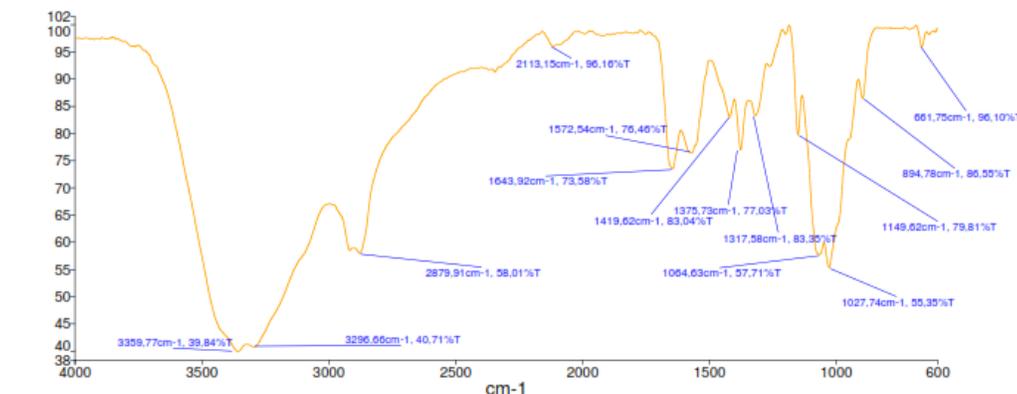
Las bandas situadas alrededor de 2879 cm^{-1} corresponden a los estiramientos simétricos y asimétricos del enlace C-H. Estas bandas son típicas en los espectros típicos de muestras de polisacáridos (Queiroz et al., 2015).

En las bandas situadas a 1643 y 1317 cm^{-1} se verifica el estiramiento de los enlaces C=O de amida primaria y C-N de amida terciaria, respectivamente. Estas interacciones indican la presencia de grupos n-acetilo residuales.

El doblamiento CH_2 y CH_3 se confirma en las bandas situadas en 1419 cm^{-1} y 1375 cm^{-1} . Finalmente, la interacción a 1064 cm^{-1} al estiramiento C-O.

Figura 14

Espectro IR del quitosano extraído



FTIR de las muestras de bio-membranas

El análisis de los espectros IR de las muestras de bio-membranas permite identificar el entrecruzamiento HFW-CH-GEN por las interacciones de la formación de enlaces característicos con la radiación IR.

En la región entre 3500 – 3200 cm⁻¹ existe una sobreposición en el estiramiento del enlace N-H de las aminas y la vibración en la banda específica del O-H, este efecto es mucho más visible en la muestra A, mientras que, en el resto las interacciones de los enlaces mencionados son más marcadas, dichas diferencias tienen relación con la solubilidad de los reactivos en la solución formadora de bio-membrana.

El pico en la región 2370 – 2335 cm⁻¹ aparece por tensión de los enlaces de CO₂, esta característica fue más evidente en las muestras B y D, mientras que en las demás muestras no se visualizaba dicha interacción. La siguiente interacción se encuentra entre 2140 – 2000 cm⁻¹ y se debe a la tensión del enlace C≡C formado en la reacción de entrecruzamiento.

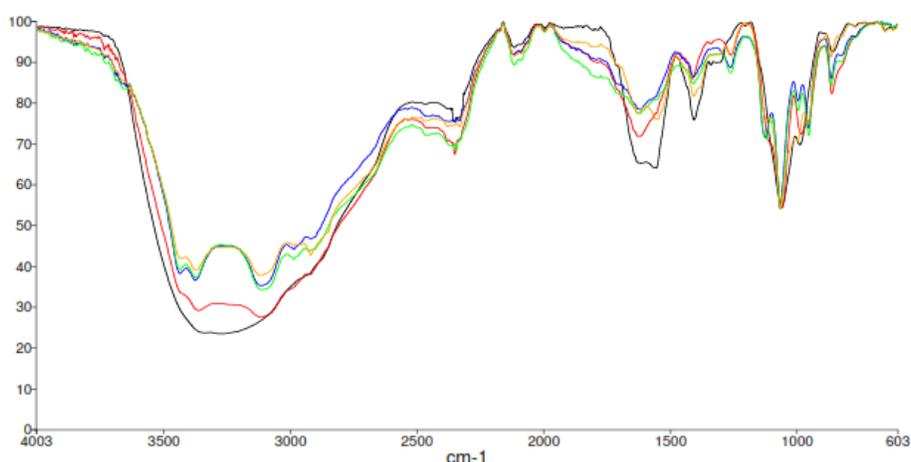
Los picos situados a 1626, 1548 y 1251 cm⁻¹ de la muestra F indican la presencia de amidas I, II y III, respectivamente, dichos compuestos están presentes en las demás muestras en diferentes proporciones. Por ejemplo, la muestra A no presenta gran variación respecto a las

bandas características de aminos I, II y III, esto indica que el proceso reactivo no fue favorable debido a la poca solubilidad de reactivos que exhibía la muestra.

La banda en $1470 - 1400 \text{ cm}^{-1}$ indica los modos vibracionales de los enlaces C-N y N-H que probablemente se han sobrepuesto con la señal de la vibración del estiramiento del anillo aromático del genipín generada a 1440 cm^{-1} (Vlasceanu et al., 2020). Por último, la banda situada entre $1085 - 1050 \text{ cm}^{-1}$ muestra la tensión del enlace C-O que es apreciable en todas las muestras debido a la presencia de genipín.

Figura 15

Espectros IR de las muestras de bio-membranas



Nota. --A, --B, --C, --D, --F.

Con base en el análisis de las bandas características en los espectros IR de las muestras de bio-membranas de la Figura 15, se demuestra que la reacción de entrecruzamiento ocurre en mayor medida en las muestras F y H. Esta afirmación se encuentra acorde a los resultados del entrecruzamiento entre los aminoácidos y genipín, ya que comparte similitudes con los picos característicos presentados en la investigación de (Vlasceanu et al., 2020).

Solubilidad

Las pruebas de solubilidad fueron realizadas por triplicado según el procedimiento descrito anteriormente y el valor considerado fue la media para cada muestra. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 9 a continuación:

Tabla 9

Porcentaje de solubilidad de las muestras

Muestra	W_{s1} (%)	W_{s2} (%)	Media
A	31.11	18.43	26.77
B	15.37	20.18	17.77
C	37.39	50.41	43.90
D	28.51	20.51	24.51
E	50.38	48.25	49.32
F	43.75	55.74	49.75
G	39.29	41.81	40.55
H	65.96	60.88	63.42

Nota. Los valores de la tabla representan la media de las pruebas realizadas.

Tomando como base que en la investigación se ha planteado el uso de las bio membranas en la agricultura, los resultados de las pruebas de solubilidad indican que la combinación más adecuada para esta aplicación es la H, dicha bio-membrana presenta mayor solubilidad en agua, este aspecto es de vital importancia para asegurar la degradabilidad del material en contacto con agua en el suelo.

Análisis del diseño experimental

El objetivo del análisis del diseño experimental utilizado en esta investigación es aumentar la solubilidad de la bio-membrana en contacto con agua para obtener biodegradabilidad en un lapso corto. Para esto se necesita verificar que las interacciones entre los factores tienen efecto significativo respecto a los efectos individuales de cada factor. En la Tabla 10 se muestra el análisis de varianza del diseño.

Tabla 10

Análisis de varianza

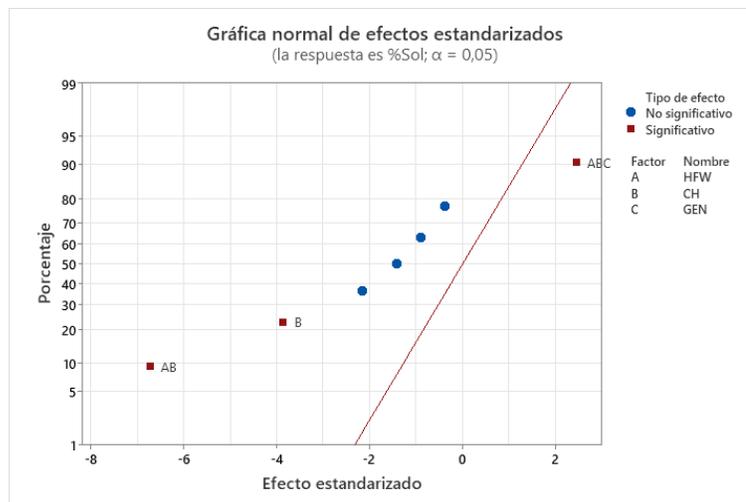
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	7	3305,30	472,19	10,56	0,002
Lineal	3	710,57	236,86	5,30	0,026
HFW	1	6,46	6,46	0,14	0,714
CH	1	667,83	667,83	14,94	0,005
GEN	1	36,27	36,27	0,81	0,394
Interacciones de 2 términos	3	2325,20	775,07	17,34	0,001
HFW*CH	1	2028,38	2028,38	45,37	<0,001
HFW*GEN	1	207,00	207,00	4,63	0,064
CH*GEN	1	89,82	89,82	2,01	0,194
Interacciones de 3 términos	1	269,53	269,53	6,03	0,040
HFW*CH*GEN	1	269,53	269,53	6,03	0,040
Error	8	357,67	44,71		
Total	15	3662,97			

Nota. Los valores de la tabla representan la media de las pruebas realizadas.

El análisis de varianza muestra que las interacciones más significativas son: CH, HFW*CH y HFW*CH*GEN, ya que tienen un valor de p que cumple la condición $p < 0.05$. Por tanto, se puede decir que existe significancia en la interacción de los 3 factores en la solubilidad de las bio-membranas.

Figura 16

Gráfica normal de los efectos

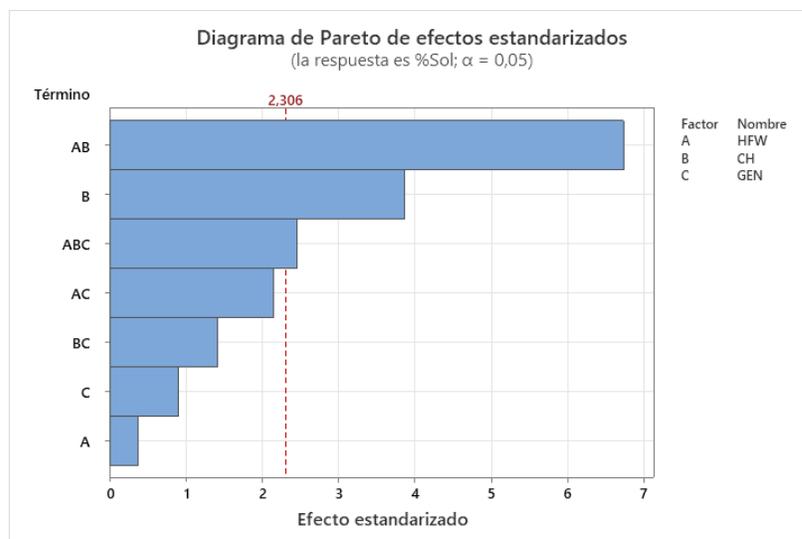


Nota. En esta gráfica se muestran las interacciones de los factores en el diseño experimental.

La gráfica de la Figura 16 muestra que las interacciones, siendo significativas, tienen efectos distintos. El efecto HFW*CH es el más significativo, sin embargo, contribuye a disminuir la solubilidad de la bio-membrana, el efecto B presenta incidencia moderada en la solubilidad. El efecto más interesante para la investigación es la interacción HFW*CH*GEN, esto muestra que las combinaciones realizadas tienen características de solubilidad distintas, aunque se varíe solamente uno de estos parámetros. Estos efectos pueden evidenciarse en la Figura 17.

Figura 17

Diagrama de Pareto



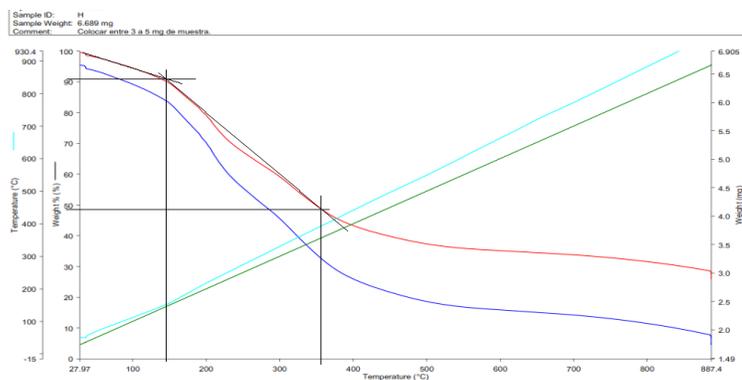
Nota. El diagrama muestra los factores que tienen más incidencia en la respuesta experimental.

Análisis termogravimétrico

La descomposición térmica de las bio-membranas se caracterizó mediante el análisis termogravimétrico (TGA) como se muestra en la Figura 18.

Figura 18

Termograma de la muestra H



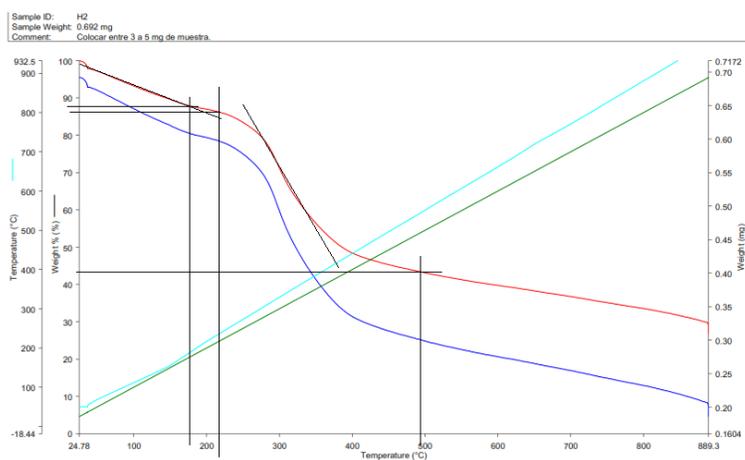
Nota. Termograma obtenido de la muestra H.

La curva TGA muestra que la descomposición térmica de la bio-membrana H presenta dos fases; la primera a 150 °C y la segunda entre 200 y 460 °C. La pérdida inicial de masa a 150 °C se atribuye a la evaporación del agua (Giteru et al., 2019).

Para esta muestra, la pérdida total de masa se encuentra en torno al 63% y las temperaturas de *onset* y *endset* son 200 y 460 °C, respectivamente. Esta observación indica que la bio-membrana H demuestra termoestabilidad hasta los 700 °C.

Figura 19

Termograma de la muestra H2



Nota. Termograma obtenido de la muestra H2.

El termograma de la Figura 19 muestra el comportamiento térmico de la muestra H2, al igual que la muestra anterior, la descomposición ocurrida a 180 °C se debe a la pérdida de agua.

Las temperaturas *onset* y *endset* son 220 y 490 °C con una pérdida de masa del 55% aproximadamente. Esta muestra contiene fibras de abacá en su estructura para mejorar sus características físicas.

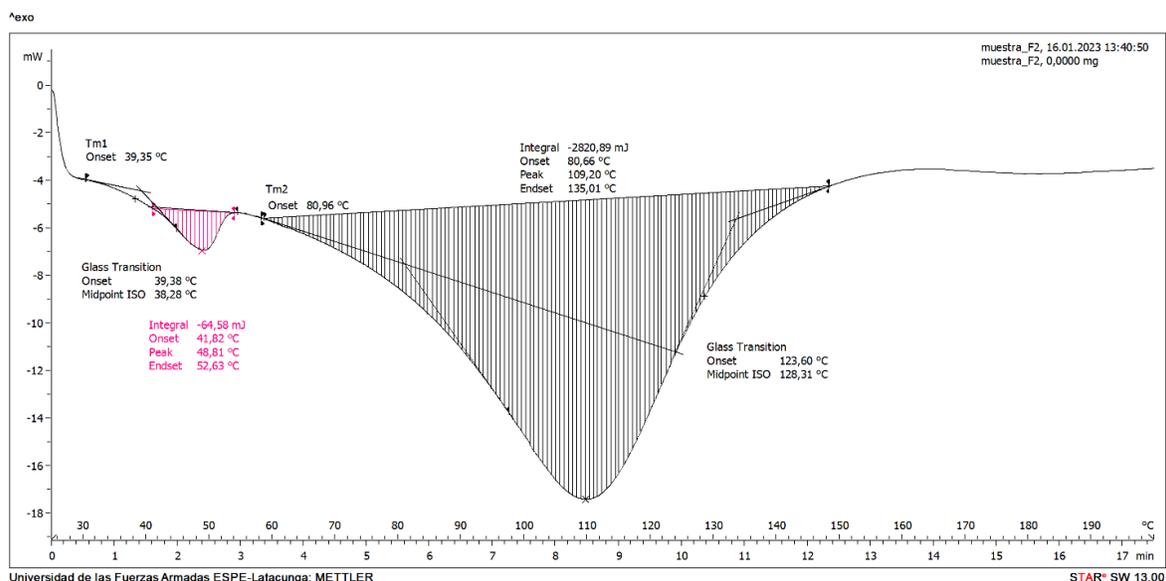
Ambas muestras indican pérdidas de masa similares, sin embargo, la pérdida de masa en la muestra H es mayor, este efecto se atribuye a la adición de fibras de abacá en la muestra H, aportando también al mejoramiento de la termoestabilidad de la estructura.

Calorimetría diferencial de barrido

El estudio de calorimetría diferencial de barrido (DSC) se realizó para determinar las características térmicas de las bio-membranas en relación con su microestructura.

Figura 20

Curva DSC de la muestra F2



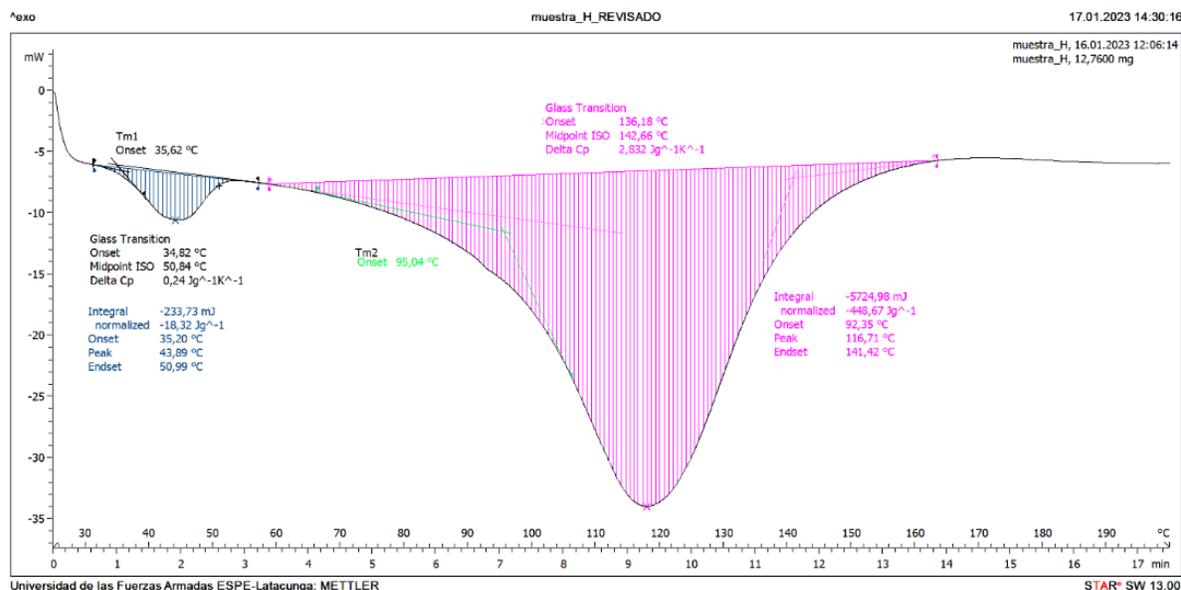
Nota. Curva DSC obtenida de la muestra F2.

La curva DSC de la muestra F2 (Figura 20), presenta dos tipos de procesos endotérmicos: el primero, con una temperatura de transición vítrea (T_g) de 39.35 °C, luego se visualiza un proceso de fusión de la fase cristalina del biopolímero con una temperatura T_m de 48.81 °C y ΔH de 64.58 mJ. El segundo proceso endotérmico presenta la pérdida de masa por presencia de agua en la muestra F2 con una T_m de 109.20 °C y ΔH de 2820.89 mJ. Dentro del

rango analizado, la muestra F2 no presenta degradación, parámetro importante para los biopolímeros ya que es uno de los factores determinantes para su aplicación.

Figura 21

Curva DSC de la muestra H



Nota. Curva DSC obtenida de la muestra H.

Los resultados de la curva DSC de la muestra H (Figura 21), indican la presencia de dos procesos endotérmicos: El primero presenta una temperatura de transición vítrea (T_g) de 35.62 °C, un proceso de fusión de la fase cristalina del biopolímero con temperatura de 43.86 °C y ΔH de 233.73 mJ. El segundo proceso está caracterizado por una temperatura de fusión T_m de 116.71 °C ΔH de 5724.89 mJ que representa la pérdida de peso por presencia de agua en la muestra H. A igual que la muestra F2, la muestra H, dentro del rango analizado, no presenta proceso de degradación.

Capítulo V

Conclusiones y recomendaciones

Conclusiones

- El proceso de transformación del sebo crudo en hidrolizado de proteína ha demostrado ser un método importante para aprovechar las proteínas del desecho, puesto que se aumenta la cantidad de nitrógeno al descartar los componentes no deseados de la matriz. Esta afirmación se corrobora mediante el análisis de nitrógeno por el método Dumas, además el hidrolizado de proteína obtenido presenta propiedades importantes como: solubilidad, facilidad de almacenamiento y bajo olor, comparado con el sebo crudo.
- El método uno para extracción de genipín presentó mejor rendimiento respecto al segundo método. El proceso propuesto en esta investigación para extracción de genipín es un método eficaz para obtener este compuesto a partir de la fruta de la *Genipa americana*. En este método están inmersos los procesos de secado de la fruta, extracción con solvente y purificación del extracto. La efectividad de la extracción se comprueba mediante el análisis de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y los solventes pueden ser reutilizados en el proceso de extracción y purificación del reactivo.
- Se determinó que la proporción de los componentes en la bio-membrana afecta su viscosidad y solubilidad. Al evaluar estas características, se identificó la combinación 3% HFW-1% CH- 0.6% GEN se ajustaba a los objetivos de la investigación. Además, se logró mejorar estas características mediante la adición de fibras de abacá, que proporcionaron una mayor resistencia.
- El uso de quitosano en las bio-membranas contribuyó a mejorar las características físicas de maleabilidad y elasticidad. La adición de fibras naturales de abacá

únicamente aportó mayor resistencia en las bio-membranas, estas fibras no tuvieron incidencia en el proceso reactivo. La conjunción de estos elementos en el resultado final de las bio-membranas resulto positiva, constituyendo una alternativa en cuanto a características físicas del producto final.

- Las características como solubilidad, termoestabilidad y biodegradabilidad de la bio-membrana con mejores propiedades físicas fueron testeadas en condiciones ambientales. Los resultados de esta prueba, junto a los resultados de solubilidad en laboratorio indican que la bio-membrana es altamente soluble en agua, mientras que, en contacto con tierra húmeda, la solubilidad es más lenta. Los resultados de los análisis térmicos (TGA y DSC) muestran termo-estabilidad frente a cambios de temperatura, incluso a altas temperaturas, este hecho indica que el calor ambiental no representa un problema en la durabilidad de la bio-membrana.
- Las bio-membranas desarrolladas presentaron características promisorias para su uso como envase para cultivos de trasplante lo que contribuye a la disminución de contaminación provocada por el uso de plásticos convencionales en la agricultura.

Recomendaciones

- Se recomienda utilizar frutos verdes de la *Genipa americana* para la extracción de genipín, ya que su contenido disminuye con la madurez de la fruta. Según experimentos y bibliografía. El solvente acetato de etilo en el proceso Soxhlet puede ser reutilizado hasta 3 veces, pero no más, ya que esto puede afectar el rendimiento total debido a la saturación de soluto en el solvente.
- Las aplicaciones del hidrolizado de proteína obtenido a partir del sebo de la curtiembre no se limitan a la mostrada en esta investigación, para futuras investigaciones se recomienda indagar acerca de las interacciones que tiene este material con otros agentes entrecruzantes o plastificantes.

- Para futuras investigaciones, se recomienda el análisis de las características microscópicas de las bio-membranas por medio de microscopía electrónica para brindar mejor comprensión de la estructura y la mezcla de los componentes en la bio-membrana.

Bibliografía

- Akter, N., Fatema, K., Azad, A. K., & Chakma, S. (2020). *Acid hydrolysis of untanned proteinous wastes from tannery industry in Bangladesh*. 9(3), 83–86.
- Álvarez, G. (2017). *Eficiente método de extracción de genipina a partir del fruto de la genipa americana*. Universidad del Valle.
- Anzani, C., Prandi, B., Tedeschi, T., Baldinelli, C., Sorlini, G., Wierenga, P. A., Dossena, A., & Sforza, S. (2018). Degradation of Collagen Increases Nitrogen Solubilisation During Enzymatic Hydrolysis of Fleshing Meat. *Waste and Biomass Valorization*, 9(7), 1113–1119. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-9866-4>
- Barba, B., Madrid, J., & Penaloza, D. (2020). A review of abaca fiber-reinforced polymer composites: different modes of preparation and their applications. *Chilean Chemical Society*, 65(3). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/s0717-97072020000204919>
- Bialecka-Florjańczyk, E., & Florjańczyk, Z. (2007). Solubility of plasticizers, polymers and environmental pollution. *Thermodynamics, Solubility and Environmental Issues*, 397–408. <https://doi.org/10.1016/B978-044452707-3/50024-0>
- Cando, C. (2021). *Boletín Técnico No 04-2020-GAD Municipales*. 04, 22.
- Cavani, L., Margon, A., Sciubba, L., Ciavatta, C., & Marzodori, C. (2017). What we talk about when we talk about protein hydrolyzate-based biostimulants. *Agriculture and Food*, 2(3), 221–232. <https://doi.org/10.3934/agrfood.2017.3.201>
- Clark, J., & Deswarte, F. (2014). The Biorefinery Concept: An Integrated Approach. In *Introduction to Chemicals from Biomass, Second Edition* (pp. 1–29). John Wiley & Sons. <https://doi.org/doi.org/10.1002/9781118714478.ch1>
- Delicano, J. (2018). A review on abaca fiber reinforced composites. *Composite Interfaces*,

25(12), 1039–1066. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/09276440.2018.1464856>

Eriksson, L., Johansson, E., Kettaneh-Wold, N., Wikstrom, C., & Wold, S. (2001). *Design of experiments: Principles and Applications* (Vol. 46, Issue 0).

Famielec, S. (2020). Chromium concentrate recovery from solid tannery waste in a thermal process. *Materials*, 13(7). <https://doi.org/10.3390/ma13071533>

Ferreira, A. . (2017). Biorefinery Concept. In *Biorefineries* (pp. 1–20). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-48288-0_1

Giteru, S. G., Ali, M. A., & Oey, I. (2019). Solvent strength and biopolymer blending effects on physicochemical properties of zein-chitosan-polyvinyl alcohol composite films. *Food Hydrocolloids*, 87(March 2018), 270–286. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.08.006>

Gutierrez, H., & de la Vara, R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos* (2nd ed.). McGraw-Hill.

Havstad, M. R. (2020). Biodegradable plastics. In *Plastic Waste and Recycling: Environmental Impact, Societal Issues, Prevention, and Solutions*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817880-5.00005-0>

Hennink, W., & Van Nostrum, C. (2012). Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Elsevier*, 64, 223–236. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.009>

Ibarz, A., Lleida, U. De, & Lleida, U. De. (2008). *Hidrolizados de proteína : procesos y aplicaciones Protein hydrolysates : processes and applications R esumen. October 2014.*

Ishihara, M., Obara, K., Nakamura, S., Fujita, M., Masuoka, K., Kanatani, Y., Yakesa, B., Hattori, H., Morimoto, Y., Ishihara, M., Maehara, T., & Kikuchi, M. (2006). Chitosan hydrogel as a drug delivery carrier to control angiogenesis. *The Japanese Society for Artificial Organs*, 9(1), 8–16. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10047-005-0313-0>

- Jung, S., Rickert, D. A., Deak, N. A., Aldin, E. D., Recknor, J., Johnson, L. A., & Murphy, P. A. (2003). *Comparison of Kjeldahl and Dumas Methods for Determining Protein Contents of Soybean Products*. 80(12), 1169–1173.
- Katsuhisa, S., & Hamaguchi, H. (2010). (12) Patent Application Publication (10) Pub . No . :
US 2010 / 0292345 A1 Patent Application Publication.
<https://patentimages.storage.googleapis.com/3b/c9/82/c283c7b24afe69/US20100019677A1.pdf>
- Kiewiet, M., Faas, M., & de Vos, P. (2018). *Immunomodulatory Protein Hydrolysates and Their Application*. 1–22. <https://doi.org/10.3390/nu10070904>
- Kluger, R., & Alagic, A. (2004). Chemical cross-linking and protein-protein interactions-a review with illustrative protocols. *Bioorganic Chemistry*, 32(6), 451–472.
<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2004.08.002>
- Koo, H., Lim, K., Jung, H., & Park, E.-H. (2006). Anti-inflammatory evaluation of gardenia extract, geniposide and genipin. *Ethnopharmacology*, 103(3), 496–500.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.08.011>
- Kundendran, D., Salma, A., Deveraj, T., Yuvarani, M., & Sivanesan, S. (2017). Utilization of leather fleshing waste as a feedstock for sustainable biodiesel production. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 39(15), 1587–1593.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1080/15567036.2017.1349218>
- Lalaleo, L. P. (2010). *Desarrollo de un Método para la Obtención de Quitosano a Partir de Caparzones de Camarón (Penaeus vannamei), Utilizando un Agente Reductor Químico*.
- Liebeck, B. M., Hidalgo, N., Roth, G., Popescu, C., & Böker, A. (2017). Synthesis and Characterization of Methyl Cellulose/Keratin Hydrolysate Composite Membranes.

Polymers, 9(3). <https://doi.org/10.3390/polym9030091>

Matteini, M., & Moles, A. (2001). *Ciencia y restauración: método de investigación*. Nerea.

Mi, F. L., Shyu, S. S., & Peng, C. K. (2005). Characterization of ring-opening polymerization of genipin and pH-dependent cross-linking reactions between chitosan and genipin. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 43(10), 1985–2000.

<https://doi.org/10.1002/pola.20669>

Ministerio de Ambiente Ecuador. (2011). La Industria De Los Cueros (a Base De Sales De Cromo, Con Agentes Vegetales). *Estudio Para Conocer Los Potenciales Impactos Ambientales y Vulnerabilidad Relacionada Con Las Sustancias Químicas y Tratamiento de Desechos Peligrosos En El Sector Productivo Del Ecuador*, 11, 127–247.

<http://www.ambiente.gob.ec/proyecto-saicm/>

Ministerio del Ambiente. (2021). *Programa Nacional para la Gestión Integral de Desechos Sólidos (PNGIDS)*. <https://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2020/07/5.PROYECTO-PNGIDS.pdf>

Montgomery, D. (2004). Diseño y análisis de experimentos. In *Limusa Wiley*.

Mourya, V., & Inamdar, N. (2008). Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore. *Elsevier*, 68(6), 1013–1051.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2008.03.002>

Mu, C., Lin, W., Zhang, M., & Zhu, Q. (2003). Towards zero discharge of chromium-containing leather waste through improved alkali hydrolysis. *Waste Management*, 23(9), 835–843.

[https://doi.org/10.1016/S0956-053X\(03\)00040-0](https://doi.org/10.1016/S0956-053X(03)00040-0)

Muzzarelli, R. (2009). Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. *Carbohydrate Polymers*, 77(1), 1–9.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.01.016>

Nagahama, H., Maeda, H., Kashiki, T., Jayakumar, R., Furuike, T., & Tamura, H. (2008). Preparation and characterization of novel chitosan/gelatin membranes using chitosan hydrogel. *Carbohydrate Polymers*, 76(2), 255–260.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.10.015>

Neri-Numa, I. A., Pessoa, M. G., Paulino, B. N., & Pastore, G. M. (2017). Genipin: A natural blue pigment for food and health purposes. *Trends in Food Science and Technology*, 67, 271–279. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.018>

Parisi, M., Nanni, A., & Colonna, M. (2021). Recycling of Chrome-Tanned Leather and Its Utilization as Polymeric Materials and in Polymer-Based Composites: A Review. *Polymers*, 13(3), 429. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/polym13030429>

Pecha, J., Barinova, M., Kolomaznik, K., Nhu, T., Tuan, A., & Le, V. T. (2021). Technological-economic optimization of enzymatic hydrolysis used for the processing of chrome-tanned leather waste. *Process Safety and Environmental Protection*, 152, 220–229.

<https://doi.org/10.1016/j.psep.2021.06.009>

Pei, Y., Yang, J., Liu, P., Xu, M., Zhang, X., & Zhang, L. (2013). Fabrication, properties and bioapplications of cellulose/collagen hydrolysate composite films. *Carbohydrate Polymers*, 92(2), 1752–1760. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.11.029>

Pineda, P., Coral, F., Álvarez, A., & Rivera, R. (2010). Papel del agua en la gelatinización del almidón de maíz: Estudio por calorimetría diferencial de barrido. *Ingeniería y Ciencia*, 6(11), 126–141.

Puhazhselvan, P., Pandi, A., Sujiritha, P. B., Antony, G. S., Jaisankar, S. N., Ayyadurai, N., Saravanan, P., & Kamini, N. R. (2022). Recycling of tannery fleshing waste by a two step

- process for preparation of retanning agent. *Process Safety and Environmental Protection*, 157, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2021.11.003>
- Queiroz, M. F., Melo, K. R. T., Sabry, D. A., Sasaki, G. L., & Rocha, H. A. O. (2015). Does the use of chitosan contribute to oxalate kidney stone formation? *Marine Drugs*, 13(1), 141–158. <https://doi.org/10.3390/md13010141>
- Real Academia Española. (n.d.). *Diccionario de la Lengua Española*. <https://dle.rae.es/>
- Saint-Denis, T., & Goupy, J. (2004). Optimization of a nitrogen analyser based on the Dumas method. *Analytica Chimica Acta*, 515(1), 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2003.10.090>
- Sandoval, A., Rodriguez, E., & Fernandez, A. (2004). Application of analysis by Differential Scanning Calorimetry (DSC) for the characterization of the modifications of the starch. *SciELO*, 72, 45–53.
- Sartore, L., Vox, G., & Schettini, E. (2013). Preparation and Performance of Novel Biodegradable Polymeric Materials Based on Hydrolyzed Proteins for Agricultural Application. *Journal of Polymers and the Environment*, 21(3), 718–725. <https://doi.org/10.1007/s10924-013-0574-2>
- Shen, Z., & Kamdem, D. P. (2015). Development and characterization of biodegradable chitosan films containing two essential oils. *International Journal of Biological Macromolecules*, 74, 289–296. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.11.046>
- Sierra, I., Gómez, S., Pérez, D., & Morante, S. (2009). *Análisis Instrumental* (Netbiblio).
- Song, J. H., Murphy, R. J., Narayan, R., & Davies, G. B. H. (2009). Biodegradable and compostable alternatives to conventional plastics. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 364, Issue 1526, pp. 2127–2139).

<https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0289>

- Souza, N., & D'Almeida, J. (2014). Tensile, Thermal, Morphological and Structural Characteristics of Abaca (*Musa textiles*) Fibers. *Polymers from Renewable Resources*, 5(2), 47–60. <https://doi.org/https://doi.org/10.1177/204124791400500201>
- Speight, J. G. (2018). *Hydrolysis 1*. 203–229. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804422-3.00006-7>
- Sundar, V., Gnanamani, A., Muralidharan, Chellappa Kannan, Narasiman Mandal, C., & Baran, A. (2011). Recovery and utilization of proteinous wastes of leather making: a review. *Rev Environ Sci Biotechnol*, 10, 151–163. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11157-010-9223-6>
- Velásquez, C. (2006). Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. *Avances En Química*, 1(2), 15–21.
- Velde, K. Van De, & Kiekens, P. (2001). Biopolymers: overview of several properties and consequences on their applications. *Polymer Testing*, 99(12), 483. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0142-9418\(01\)00107-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0142-9418(01)00107-6)
- Vlasceanu, G. M., Crica, L. E., Pandele, A. M., & Ionita, M. (2020). Graphene Oxide Reinforcing Genipin Crosslinked Chitosan-Gelatin Blend Films. *Coatings*, 10(2). <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/coatings10020189>
- Wu, J., Zhong, F., Li, Y., Shoemaker, C. F., & Xia, W. (2013). Preparation and characterization of pullulan-chitosan and pullulan-carboxymethyl chitosan blended films. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 82–91. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.04.002>
- Wu, S., & Horn, G. (2010). (12) Patent Application Publication (10) Pub . No . : US 2013 / 0115252A1. In *Yeast*.

- Yilmaz, O., Kantarli, C., Yuksel, M., Saglam, M., & Yanik, J. (2007). Conversion of leather wastes to useful products. *Resources, Conservation and Recycling*, 49(4), 436–448. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2006.05.006>
- Yoo, J. S., Kim, Y. J., Kim, S. H., & Choi, S. H. (2011). Study on genipin: A new alternative natural crosslinking agent for fixing heterograft tissue. *Korean Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 44(3), 197–207. <https://doi.org/10.5090/kjtcs.2011.44.3.197>
- Yu, Y., Xu, S., Lic, S., & Pan, H. (2021). Genipin-cross-linked hydrogels based on biomaterials for drug delivery: a review. *Biomaterials Science*, 9, 1583–1597. <https://doi.org/10.1039/d0bm01403f>
- Zhu, Q., Zhu, J., & Zhu, M. (2014). *Method for direct extraction of genipin from waste liquid in gardenia yellow pigment production* (Patent No. CN104152508A).

Anexos