

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS

PRODUÇÃO DE PLÁSTICOS BIODEGRADÁVEIS À BASE DE QUERATINA
EXTRAÍDA DE PENAS DE FRANGO POR ROTAS VERDES

Rafael Marques Vanderlei

São Carlos-SP
2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS

PRODUÇÃO DE PLÁSTICOS BIODEGRADÁVEIS À BASE DE QUERATINA
EXTRAÍDA DE PENAS DE FRANGO POR ROTAS VERDES

Rafael Marques Vanderlei

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciência e Engenharia
de Materiais como requisito parcial à
obtenção do título de DOUTOR EM
CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS

Orientador: Dr. Luiz Henrique Capparelli Mattoso

Coorientador: Dr. Francys Kley Vieira Moreira

Agência Financiadora: CAPES - Processo: 88887.334765/2019-00

São Carlos-SP
2023

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Luiz Carlos Marques Vanderlei e Derci Marques Vanderlei, que sempre me incentivaram aos estudos.

VITAE

Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais pela Universidade Federal de São Carlos (2019).

Bacharel em Engenharia de Materiais pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Londrina (2017).



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado do candidato Rafael Marques Vanderlei, realizada em 23/10/2023.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Luiz Henrique Capparelli Mattoso (EMBRAPA)

Prof. Dr. Luiz Antonio Pessan (UFSCar)

Profa. Dra. Sílvia Helena Prado Bettini (UFSCar)

Profa. Dra. Nathália Ramos de Melo (UFF)

Profa. Dra. Elisângela Corradini (UTFPR)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Prof. Luiz H. C. Mattoso, expresso minha gratidão pelo apoio, conhecimento e valiosas sugestões fornecidas ao longo de todo o projeto de pesquisa. Sobretudo pela compreensão e humanidade durante esses 6 anos de orientação.

Ao Dr. Prof. Francys K. V. Moreira, meu mais sincero reconhecimento por não apenas me acolher como aluno, mas também reconhecer as minhas ideias ao longo de toda a jornada na pós-graduação. Seu apoio constante, carinho e generosidade de tempo foram essenciais para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos meus amigos de pós-graduação: Bruno Ribeiro Luchesi, Marina Soares de Azerêdo, Rafael Gouveia Lazarini, entre outros, agradeço pelos momentos de descontração que nos ajudaram a superar os desafios nesses anos de mestrado e doutorado.

À todos os colaboradores da Embrapa Instrumentação, Adriana Coatrini Thomazi, Alice Raabe de Pina, Joana Dias Bresolin, Luiz Francisco de Mattêo Ferraz, Paulo Renato Orlandi Lasso, Silviane Zanni Hubinger, Viviane Faria Soares, pelo suporte técnico de excelência.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Instrumentação (EMBRAPA Instrumentação) por toda a infraestrutura, recursos humanos e financeiros dispensados a este trabalho.

À Universidade Federal de São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais pela infraestrutura e oportunidade de doutorado.

À CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo apoio financeiro para realização desse trabalho com bolsa de estudos, processo nº 88887.334765/2019-00.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

A pena de frango é um subproduto amplamente gerado pela agroindústria. No entanto, sua produção em larga escala e os desafios associados à gestão de resíduos levantam preocupações substanciais quanto ao seu destino. As penas de frango são compostas predominantemente por queratina, uma proteína que detém potencial para ser valorizada na forma de novos materiais biodegradáveis com propriedades físicas desejáveis à diversas aplicações. Nessa tese de doutorado, a queratina foi extraída de resíduo industrial de pena de frango por meio da sulfitólise, seguida de recuperação utilizando diversos agentes precipitantes: HCl, ácido cítrico, NaCl e acetona. A metodologia empregada viabilizou a extração da queratina de maneira rápida e passível de escalonamento, empregando reagentes de baixo custo e atóxicos, dispensando a necessidade de diálise, com destaque para a precipitação com acetona para a qual um rendimento de recuperação de 80% foi obtido. A avaliação do ciclo de vida delineou os principais gargalos ambientais da produção da queratina, e o conceito de economia circular foi estudado para mitigar os impactos ambientais. A análise química revelou que as ligações dissulfeto presentes na queratina foram convertidas em S-sulfocisteína, facilitando seu processamento por termo-prensagem. Foram produzidos filmes termoplásticos transparentes e insolúveis em água, características desejáveis para aplicações em embalagens, por exemplo. O método de precipitação adotado teve implicações diretas na distribuição da massa molar, morfologia e hidrofobicidade dos filmes de queratina. Essas características permitiram a obtenção de filmes com uma gama de propriedades mecânicas, abrangendo desde filmes rígidos, com um módulo elástico acima de 400 MPa, até filmes com um alongamento superior a 70%, para uma resistência à tração em torno de 10 MPa. Os resultados deste estudo evidenciam o potencial de valorização do resíduo de pena de frango no desenvolvimento de materiais biodegradáveis e com impacto ambiental reduzido.

Palavras-chave: Avaliação de ciclo de vida; Filme biodegradável; Precipitação; Queratina; Termo-prensagem.

ABSTRACT

PRODUCTION OF BIODEGRADABLE PLASTICS BASED ON KERATIN EXTRACTED FROM CHICKEN FEATHERS BY GREEN ROUTES

Chicken feather is a by-product widely generated by the poultry agroindustry. However, its large-scale production and the challenges associated with waste management raise substantial concerns about its environmental impacts. Chicken feathers are predominantly composed of keratin, a protein that can be potentially valued towards new biodegradable materials with desirable physical properties for various applications. Focusing on this major objective, in this doctoral thesis, keratin was extracted from industrial chicken feather waste through sulfitolysis, followed by recovery using various precipitating agents: HCl, citric acid, NaCl, and acetone. This approach enabled the extraction of keratin in a dialysis-free, fast, and scalable way, using low-cost and non-toxic reagents, with emphasis on the acetone precipitation for which a recovery yield of 80% was obtained. Life cycle assessment outlined the main environmental hotspots in the keratin production, and a circular economy concept was studied to mitigate its environmental impacts. Chemical analysis revealed that the disulfide bonds present in keratin were converted into S-sulfocysteine, facilitating the keratin processing by thermo-molding. Transparent and water-insoluble thermoplastic films were produced with desirable properties for packaging applications, for example. The precipitating agents had direct implications on the distribution of molar mass, morphology, and hydrophobicity of the keratin films. These characteristics allowed obtaining films with a range of mechanical properties, from rigid films, with an elastic modulus above 400 MPa, to films with elongation at break as large as 70%, for a tensile strength around 10 MPa. This thesis shows the potential for valuing chicken feather waste in the development of biodegradable keratin-based materials with reduced environmental footprints.

Keywords: Biodegradable film; Compression molding; Keratin; Life cycle assessment; Precipitation.

PUBLICAÇÕES

VANDERLEI, R. M.; NOVO-MANSUR, M. T. M.; MATTOSO, L. H. C.; MOREIRA, F. K. V. Effect of Precipitation Methods on Physicochemical Properties of Keratin Films Produced from Chicken Feather Waste. **Journal of Applied Polymer Science**. (Artigo aprovado).

VANDERLEI, R. M.; MATTOSO, L. H. C.; MOREIRA, F. K. V. Hotspot Analysis of Keratin Production from Chicken Feather Waste. In: **OpenLCA conference**. (Apresentação oral em congresso).

ÍNDICE DE ASSUNTOS

	Pág.
FOLHA DE APROVAÇÃO.....	i
AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO.....	v
ABSTRACT	vii
PUBLICAÇÕES.....	ix
SUMÁRIO.....	xi
ÍNDICE DE TABELAS	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xv
SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	xix
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2.1 Polímeros biodegradáveis	5
2.2 Aminoácidos, peptídeos e proteínas.....	6
2.3 Precipitação de proteínas	13
2.4 Pena de frango e resíduo da indústria avícola.....	17
2.5 Queratina	24
2.6 Metodologias de extração de queratina	25
2.7 Filmes biodegradáveis de queratina	34
3 OBJETIVOS.....	41
4 MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1 Materiais	43
4.2 Pré-tratamento do resíduo de pena de frango	43
4.3 Extração de queratina por sulfitólise	43
4.4 Precipitação de queratina	44
4.5 Produção de filmes de queratina por termo-prensagem	45
4.6 Rendimento da extração de queratina	45
4.7 Análise elementar	46
4.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida	46
4.9 Difractometria de raios-X.....	47
4.10 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier	48

4.11	Análise termogravimétrica	49
4.12	Microscopia eletrônica de varredura	49
4.13	Ensaio de Tração	49
4.14	Colorimetria	50
4.15	Espectroscopia na região do ultravioleta-visível	50
4.16	Determinação da solubilidade e capacidade de absorção de água	50
4.17	Ângulo de contato	51
4.18	Avaliação de ciclo de vida	51
4.19	Análise estatística	54
4.20	Diagrama da metodologia	54
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1	Extração e precipitação de queratina	57
5.2	Caracterização estrutural das queratinas	62
5.3	Avaliação de ciclo de vida	68
5.4	Caracterização morfológica e estrutural dos filmes biodegradáveis	74
5.5	Propriedades físicas dos filmes biodegradáveis	81
6	CONCLUSÕES	91
7	SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS	93
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
	APÊNDICE A	115
	APÊNDICE B	119
	APÊNDICE C	121
	APÊNDICE D	125
	APÊNDICE E	127
	APÊNDICE F	129
	APÊNDICE G	131

ÍNDICE DE TABELAS

	Pág.
Tabela 2.1 - Teor de aminoácidos das penas de frango e suas subestruturas em porcentagens proporcionais (% total AA) [36,78].	23
Tabela 2.2 - Propriedades mecânicas de alguns filmes de queratina.	35
Tabela 4.1 - Atribuição das posições da banda amida I à estrutura secundária das proteínas [146]......	48
Tabela 4.2 - Categorias de impacto ambiental estudadas na análise de ciclo de vida da produção de queratina.	54
Tabela 5.1 - Composição elementar das penas de frango limpas (CCF) e queratinas precipitadas por ácido clorídrico (KHA), ácido cítrico (KCA), cloreto de sódio (KSC) e acetona (KAT). Médias acompanhadas pela mesma letra não diferem significativamente pelo método de Tukey ($p > 0,05$).	59
Tabela 5.2 - Bandas visíveis e suas respectivas intensidades, massa molar numérica média (M_n), massa molar ponderada média (M_w) e índice de polidispersividade (IP) das queratinas precipitadas por ácido clorídrico (KHA), ácido cítrico (KCA), cloreto de sódio (KSC) e acetona (KAT)......	62
Tabela 5.3 - Comparação das frações de estrutura secundária e cristalinidade entre as metodologias de deconvolução. Penas de frango (CCF) e queratinas precipitadas (Prec.) ou em filme por ácido clorídrico (KHA), ácido cítrico (KCA), cloreto de sódio (KSC) e acetona (KAT).	81
Tabela 5.4 - Propriedades mecânicas dos filmes de queratina de penas de frango a 25 °C e 54% de umidade relativa. Resistência à tração (σ_{UTS}), alongamento na ruptura (ϵ_{break}), módulo elástico (E) e tenacidade (U_T). Médias acompanhadas pela mesma letra não diferem significativamente pelo método de Tukey ($p > 0,05$).	82
Tabela 5.5 - Parâmetros de cor no sistema CIELab dos filmes de queratina e resultados comparativos de resíduo de pena de frango antes e após a purificação com NaClO ou H ₂ O ₂ . Luminosidade (L), transparência (T), e coordenadas cromáticas a (a < 0, verde) e b (b > 0, amarelo). Médias acompanhadas pela mesma letra não diferem significativamente pelo método de Tukey ($p > 0,05$).	84

Tabela 5.6 - Estabilidade em água dos filmes de queratina de penas de frango. Teor de umidade (M), capacidade de absorção de água (U_w) e solubilidade em água (S_w). Médias acompanhadas pela mesma letra não diferem significativamente pelo método de Tukey ($p > 0,05$). 87

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 2.1 - Classificação de polímeros biodegradáveis de acordo com a sua origem e método de produção, assim como alguns exemplos, com destaque a queratina [41]. Pontilhado indica materiais de fonte não renovável.	6
Figura 2.2 - Propriedades e convenções associadas a aminoácidos encontrados em proteínas. Estados de ionização estão em pH 7. pI = Ponto isoelétrico; MM = Massa molar; I_H = Índice de hidropatia; X_p = Ocorrência média em proteínas; e R = Grupo lateral. Adaptado de Nelson e Cox (2017) [46].	7
Figura 2.3 - Reação de condensação entre dois α -aminoácidos. R_1 e R_2 são os grupos laterais dos aminoácidos.	8
Figura 2.4 - Fenômeno de ressonância em uma ligação peptídica. R_1 e R_2 referem-se à continuação da cadeia peptídica.	9
Figura 2.5 - Oxidação e redução de resíduos de cisteína em resíduo de cistina.	10
Figura 2.6 - Exemplos de diferentes níveis de estrutura nas proteínas [46].	11
Figura 2.7 - Representação esquemática da estrutura (a) hélice- α ; e folha- β (antiparalela) [57,58].	12
Figura 2.8 - Estruturas de dobras em proteínas. Dobras- β dos tipos I e II são as mais comuns. Adaptado de [46].	13
Figura 2.9 - Distribuição de cargas de uma proteína em função do pH.	14
Figura 2.10 - Representação esquemática da solubilidade de proteínas em função da concentração de sal.	15
Figura 2.11 - Produção histórica de carne de frango no Brasil. Baseado em números do IBGE 2012 e 2021 [64,65].	17
Figura 2.12 - Aparência e contaminações do resíduo industrial de pena de frango logo após a sua remoção do animal e primeira lavagem.	19
Figura 2.13 - Tipos de penas e suas estruturas. Imagem adaptada de Baron, J. R. (2018) [77].	21
Figura 2.14 - Visão esquemática da microestrutura e morfologia da pena de frango [74,86].	24
Figura 2.15 - Exemplos de interação química presente na queratina.	25

Figura 2.16 - Evolução da microestrutura dos tecidos de queratina desde a escala atômica até a formação de filamentos intermediários [90].	26
Figura 2.17 - Reação genérica da redução da ligação dissulfeto.	27
Figura 2.18 - Reação genérica de oxidação da ligação dissulfeto.	29
Figura 2.19 - Reação genérica de sulfitólise da ligação dissulfeto.	31
Figura 4.1 - Diagrama dos processos e contorno do sistema da produção de queratina de pena de frango. O inventário de ciclo de vida se encontra completo no Apêndice C. A = massa de acetona reciclada; BT = baixa tensão; Deion. = deionizada; e Eletric. = eletricidade.	53
Figura 4.2 - Diagrama esquemático da metodologia da tese de doutorado. Azul representa os processos produtivos, laranja indica os materiais produzidos, e verde são as análises realizadas.	55
Figura 5.1 - Rendimento de precipitação de queratina por ácido clorídrico (KHA, laranja), ácido cítrico (KCA, verde), cloreto de sódio (KSC, vermelho) e acetona (KAT, azul). Médias acompanhadas pela mesma letra não diferem significativamente pelo método de Tukey ($p > 0,05$).	57
Figura 5.2 - Eletroforese em gel das queratinas precipitadas por ácido clorídrico (KHA), ácido cítrico (KCA), cloreto de sódio (KSC) e acetona (KAT). Massa molar (MM) foi calculada pela distância percorrida pelas bandas.	60
Figura 5.3 - Padrões de difração de raios-X das penas de frango (CCF, preto) e queratinas precipitadas por ácido clorídrico (KHA, laranja), ácido cítrico (KCA, verde), cloreto de sódio (KSC, vermelho) e acetona (KAT, azul).	63
Figura 5.4 - Espectros ATR-FTIR das penas de frango (CCF, preto) e queratinas precipitadas com ácido clorídrico (KHA, laranja), ácido cítrico (KCA, verde), cloreto de sódio (KSC, vermelho) e acetona (KAT, azul).	65
Figura 5.5 - Análise termogravimétrica das penas de frango (CCF, preto) e queratinas precipitadas por ácido clorídrico (KHA, laranja), ácido cítrico (KCA, verde), cloreto de sódio (KSC, vermelho) e acetona (KAT, azul). (a) Curvas termogravimétricas e (b) curvas termogravimétricas derivadas.	67
Figura 5.6 - Resultados relativos da avaliação do ciclo de vida da queratina de penas de frango extraída por sulfitólise e precipitada com ácido clorídrico (KHA,	

● laranja), ácido cítrico (KCA, ■ verde), cloreto de sódio (KSC, ◆ vermelho) e acetona sem (KAT, ▲ azul) e com reciclagem de 90% (KAT_90, + preto)..... 69

Figura 5.7 - Algumas categorias de impacto ambiental em valores absolutos de cada conjunto de processos que compreendem a produção de queratina extraída por sulfitólise e precipitada com ácido clorídrico (KHA), ácido cítrico (KCA), cloreto de sódio (KSC) e acetona com diferentes frações de reciclagem (acetona pura = KAT, 25% = KAT_25, 50% = KAT_50, 75% = KAT_75, 90% = KAT_90).
..... 72

Figura 5.8 - Aspecto visual dos (a) filmes biodegradáveis de queratina termoplástica (25% glicerol) e comparativo com filmes obtidos (b) por hidrólise alcalina (NaOH) e termo-prensagem (20% glicerol) [167], (c) por redução (Na₂S) seguido de solubilização (NaOH) e *casting* de solução (3,5% de glicerol e 0,2% celulose microcristalina) [168], e (d) por redução (L-cisteína) e *casting* de solução (10% glicerol) [61]. 75

Figura 5.9 - Micrografias por MEV-FEG das fraturas criogênicas dos filmes de queratina precipitada por (a) ácido clorídrico (KHA), (b) ácido cítrico (KCA), (c) cloreto de sódio (KSC) e (d) acetona (KAT). 76

Figura 5.10 - Espectros FTIR das penas de frango (CCF, preto) e filmes de queratina precipitada por ácido clorídrico (KHA, laranja), ácido cítrico (KCA, verde), cloreto de sódio (KSC, vermelho) e acetona (KAT, azul). 77

Figura 5.11 - Padrões de difração de raios-X das penas de frango (CCF, preto) e filmes de queratina precipitada por ácido clorídrico (KHA, laranja), ácido cítrico (KCA, verde), cloreto de sódio (KSC, vermelho) e acetona (KAT, azul). 79

Figura 5.12 - Curvas de tração típicas dos filmes de queratina precipitada por ácido clorídrico (KHA, laranja), ácido cítrico (KCA, verde), cloreto de sódio (KSC, vermelho) e acetona (KAT, azul). 83

Figura 5.13 - Espectros de absorção UV-Vis dos filmes de queratina. Absorbância maior que 2 representa uma transmitância menor que 1%. 86

Figura 5.14 - Ângulo de contato dinâmico entre gotas de água de 5 µL e as superfícies dos filmes KHA (laranja ●), KCA (verde ■), KSC (vermelho ◆) e KAT (azul ▲). As imagens da esquerda para a direita são quadros individuais em 1,

10, 60 e 120 segundos, respectivamente. Médias acompanhadas pela mesma letra não diferem significativamente pelo método de Tukey ($p > 0,05$). 88

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

a	Coordenada cromática a (verde/vermelho)
A	Área
ACV	Avaliação de ciclo de vida
AICV	Avaliação dos impactos do ciclo de vida
ASTM	Sociedade Americana de Testes e Materiais (<i>American Standard for Testing of Materials</i>)
ATR	Reflectância total atenuada (<i>Attenuated total reflectance</i>)
b	Coordenada cromática b (azul/amarelo)
BSA	Albumina de soro bovino (<i>Bovine serum albumin</i>)
CCF	Pena de frango limpa (<i>cleaned chicken feather</i>)
DRX	Difratometria de raio-X
DTG	Termogravimetria derivada (<i>Derivative thermogravimetry</i>)
E	Módulo de elasticidade/Módulo de Young
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>)
FEG	Feixe eletrônico por emissão de campo
FI	Filamento intermediário
FSRS	Categoria escassez de recursos fósseis
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (<i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i>)
FWTX	Categoria ecotoxicidade de água doce
GLWM	Categoria aquecimento global
HNTX	Categoria toxicidade humana não carcinogênica
ICV	Inventário de ciclo de vida
I _H	Índice de hidropatia
IP	Índice de polidispersividade
L	Luminosidade
LAND	Categoria uso da terra
KAT	Queratina precipitada com acetona (<i>Keratin by acetone</i>)
KCA	Queratina precipitada com ácido cítrico (<i>Keratin by citric acid</i>)
KHA	Queratina precipitada com HCl (<i>Keratin by hydrochloric acid</i>)

KSC	Queratina precipitada com NaCl (<i>Keratin by sodium chloride</i>)
m	Massa de queratina liofilizada
m_0	Massa inicial de pena de frango ou filme de queratina
m_s	Massa seca após absorção de água
m_i	Massa úmida após absorção de água
M_n	Massa molar numérica média
M_w	Massa molar ponderal média
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MM	Massa molar
MWCO	Massa molar de corte (<i>Molecular weight cutoff</i>)
MWD	Distribuição de massa molar (<i>Molecular weight distribution</i>)
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida (<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
PBAT	Poli(butileno adipato-co-tereftalato)
PCL	Policaprolactona
PE	Polietileno
pH	Potencial hidrogeniônico
PHB	Polihidroxibutirato
PHBV	Poli(hidroxibutirato-co-valerato)
pI	Ponto isoelétrico
PLA	Poli(ácido láctico)
PP	Polipropileno
PVOH	Poli(álcool vinílico)
R	Grupo lateral
RCF	Força centrífuga relativa (<i>Relative centrifugal force</i>)
S_w	Solubilidade em água (<i>Water solubility</i>)
SDS	Dodecilsulfato de sódio (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
T	Transparência do filme de queratina
T_{onset}	Temperatura de degradação
TGA	Análise termogravimétrica (<i>Thermogravimetric Analysis</i>)
U_w	Capacidade de absorção de água (<i>Water uptake capacity</i>)

UR	Umidade relativa
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Espectroscopia no ultravioleta-visível
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência
WTRC	Categoria consumo de água
X_c	Índice de cristalinidade
X_{branco}	Luminosidade em padrão branco
X_{preto}	Luminosidade em padrão preto
X_p	Ocorrência média do aminoácido em proteínas
Y	Rendimento da extração de queratina (<i>Yield</i>)
Å	Ângstrom
α	Alfa
β	Beta
ΔG	Varição da energia livre de Gibbs
ϵ_{break}	Alongamento na ruptura
ϵ_r	Constante dielétrica
λ	Comprimento de onda
μ	Micro
2θ	Ângulo de difração de Bragg
σ_{UTS}	Resistência a tração (<i>Ultimate tensile strength</i>)

1 INTRODUÇÃO

A indústria avícola tem crescido constantemente ao longo dos anos. De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, *Food and Agriculture Organization*), a produção de carne de aves aumentou de 100 Mt em 2010 para mais de 135 Mt em 2020 [1,2]. O consumo de tal produto seguirá essa tendência, podendo alcançar mais de 150 Mt até 2031 devido ao menor custo produtivo e à alta razão proteína/gordura deste tipo de carne que é atraente para os consumidores [3]. Todavia, a produção e o consumo de carne de aves têm levado a sérias preocupações ambientais devido ao principal subproduto gerado pela indústria - as penas [4,5]. As penas de frango representam cerca de 7% da massa total do animal e, portanto, o grande volume desse resíduo deve ser corretamente descartado [6,7]. Devido à sua abundância, resistência química e potencial para transportar patógenos transmitidos pelo sangue, as penas de frango podem representar um risco significativo tanto para a saúde humana quanto para o meio ambiente [8,9].

As penas de frango são uma fonte natural, barata e abundante de queratina [10,11]. A queratina é uma proteína fibrosa rica em cisteína que forma tecidos externos em animais, como cabelo, chifres, penas, lã, unhas, entre outros [12]. Essa proteína se diferencia de outras proteínas pelo alto teor de ligações dissulfeto entre suas cadeias, além de interações de van der Waals, ligações de hidrogênio e ligações iônicas [13]. Tais interações contribuem para o desenvolvimento de uma estrutura altamente compacta com elevadas propriedades mecânicas e resistência química [14,15]. Essas propriedades são desejáveis em muitas aplicações, como partículas para remoção de metais pesados [16], fibras para a indústria têxtil [17,18], hidrogéis e *scaffolds* para engenharia de tecidos [19–21] e filmes resistentes à água para embalagens [6,22,23]. Portanto, a valorização da queratina contida nas penas de frango pode proporcionar o desenvolvimento de materiais economicamente viáveis e ecologicamente corretos para diferentes tecnologias e aplicações [24].

A queratina pode ser extraída das penas de frango por meio de várias metodologias, sendo os métodos químicos aqueles mais utilizados [25]. Essas extrações são somente possíveis devido ao rompimento das interações

presentes na queratina a partir de agentes redutores ou oxidantes, normalmente com o auxílio de desnaturantes de proteínas e surfactantes [17,26,27]. A purificação da queratina é geralmente realizada por meio de diálise contra água destilada, onde os reagentes difundem através de uma membrana semipermeável devido a um gradiente de concentração. No entanto, a diálise requer grandes quantidades de água, longos períodos de purificação e membranas caras que são limitadas à escala laboratorial [28,29]. Além disso, é relatado que peptídeos menores de queratina podem escapar da membrana de diálise [30]. Da mesma forma, muitos métodos químicos empregam reagentes tóxicos e caros para extrair queratina, o que levanta preocupações acerca da pegada ambiental do descarte dos resíduos de diálise [31,32].

A precipitação direta da queratina a partir da solução de extração pode oferecer uma alternativa mais verde, rápida e barata para a purificação desse biopolímero, porém essa rota não é geralmente relatada na literatura. A precipitação de proteínas pode ser alcançada pelo aumento das interações proteína-proteína induzidas por variações de potencial hidrogeniônico (pH), temperatura, concentração de sal ou solventes orgânicos [33,34]. A queratina obtida por precipitação geralmente se torna insolúvel, no entanto, a proteína ainda pode ser conformada por processamentos típicos de polímeros termoplásticos, como a termo-prensagem e a extrusão, o que é relevante para a produção de plásticos biodegradáveis [35,36].

A presente tese de doutorado compreende um amplo estudo de valorização da queratina de penas de frango mediante o desenvolvimento de rotas verdes de extração e a posterior avaliação da queratina precipitada como filme plástico biodegradável. A queratina de pena de frango foi extraída por sulfitolise usando metabissulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) como agente redutor e ureia como desnaturante. A queratina foi então precipitada diretamente da solução de sulfitolise usando diferentes precipitantes, incluindo ácido clorídrico, ácido cítrico, cloreto de sódio ou acetona. Essa abordagem foi escolhida por ser uma alternativa mais ambientalmente correta para a produção de queratina. Filmes plásticos flexíveis de queratina foram obtidos por termo-prensagem utilizando o plastificante glicerol. O eixo centro dos estudos aqui apresentados residiu no

entendimento da influência dos diferentes agentes de precipitação sobre a físico-química macromolecular das queratinas extraídas e, conseqüentemente, sobre a microestrutura e propriedades mecânicas, óticas, térmicas e de interação com água dos filmes plásticos produzidos. Assim, declara-se a originalidade desta tese de doutorado e sua contribuição para o estado da arte da ciência e engenharia de novos materiais baseados em queratina.

Dada a abrangência do tema, a presente tese se inicia com uma revisão da literatura que contém, além das publicações de maior relevância sobre extração e filmes biodegradáveis de queratina, conceitos fundamentais sobre a físico-química de aminoácidos, proteínas, além da microestrutura hierárquica da pena de frango. Uma ênfase especial foi dada também para os mecanismos associados à precipitação de proteínas. Na sequência, são apresentados os grandes objetivos da tese e os métodos escolhidos para atingi-los. O tópico seguinte é dedicado aos resultados da tese e suas discussões, os quais foram divididos em (i) caracterização físico-química das queratinas precipitadas e seus ecoindicadores e (ii) caracterização microestrutural e físico-química dos filmes de queratina obtidos por termo-prensagem. Encontram-se ao final da tese o capítulo com as conclusões e as sugestões para trabalhos futuros. Por fim, ressalta-se o conteúdo dos apêndices logo após as referências, em especial o Apêndice A, o qual contém a lista de termos de trabalho adotados para esta tese.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Polímeros biodegradáveis

Os polímeros não-biodegradáveis, exemplificados na maioria dos plásticos convencionais sintéticos como o polietileno (PE), polipropileno (PP), dentre outros, têm sido amplamente utilizados ao longo dos anos devido à sua versatilidade e baixo custo. No entanto, o uso excessivo juntamente com o descarte inadequado acarreta sérios problemas ambientais atualmente [37]. A crescente conscientização sobre os impactos ambientais causados pelos plásticos não-biodegradáveis tem impulsionado um crescente interesse em desenvolver alternativas para esses materiais [38,39]. Diversos polímeros biodegradáveis têm sido estudados e aplicados para mitigar a dependência massiva desses polímeros convencionais, principalmente em aplicações de curta duração [40].

Polímeros biodegradáveis são aqueles que podem ser decompostos por micro-organismos, como fungos e bactérias, em condições adequadas de temperatura, pH, umidade, oxigenação, entre outras [41]. Essa degradação gera como produtos água, dióxido de carbono, metano, biomassa, entre outras substâncias naturais que são absorvidas e reintegradas ao ambiente [37,41]. Os polímeros biodegradáveis podem ser classificados de acordo com a sua fonte de obtenção, como esquematizado na Figura 2.1. Os polímeros biodegradáveis naturais podem ser extraídos diretamente de fontes renováveis, sendo representados principalmente pelos polissacarídeos, como o amido e a celulose, e as proteínas, como a queratina e o colágeno. Este grupo também inclui os polímeros biodegradáveis produzidos a partir de micro-organismos, como é o caso do polihidroxitirato (PHB). Os polímeros biodegradáveis sintéticos, por outro lado, podem ser produzidos tanto por derivados do petróleo, como a policaprolactona (PCL), quanto por monômeros derivados de biomassa, como o poli(ácido láctico) (PLA) [42].

Os polissacarídeos e as proteínas são polímeros biodegradáveis atóxicos e abundantes na natureza, sendo excelentes candidatos para substituir alguns plásticos convencionais não-biodegradáveis em diversas aplicações [43–45]. Entretanto, o desempenho desses materiais é limitado pela resistência mecânica

dependente da umidade, solubilidade em água e processamento complexo. Nesse contexto, a queratina se torna uma alternativa de grande interesse para a produção de polímeros biodegradáveis, já que é oriunda de resíduos industriais e insolúvel em água após o processamento, além de apresentar propriedades adequadas para diversas aplicações.

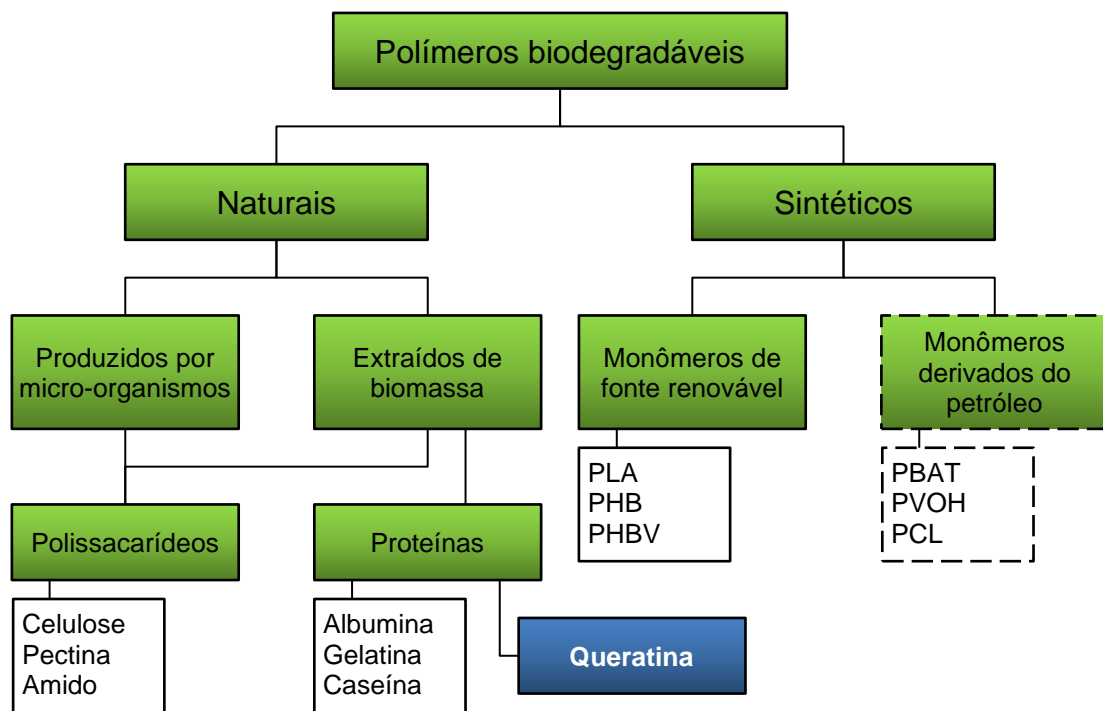


Figura 2.1 - Classificação de polímeros biodegradáveis de acordo com a sua origem e método de produção, assim como alguns exemplos, com destaque a queratina [41]. Pontilhado indica materiais de fonte não renovável.

2.2 Aminoácidos, peptídeos e proteínas

As proteínas são macromoléculas poliméricas formadas por aminoácidos como unidades de repetição [46]. Os aminoácidos mais comumente encontrados em proteínas estão listados na Figura 2.2, assim como suas propriedades e algumas convenções.

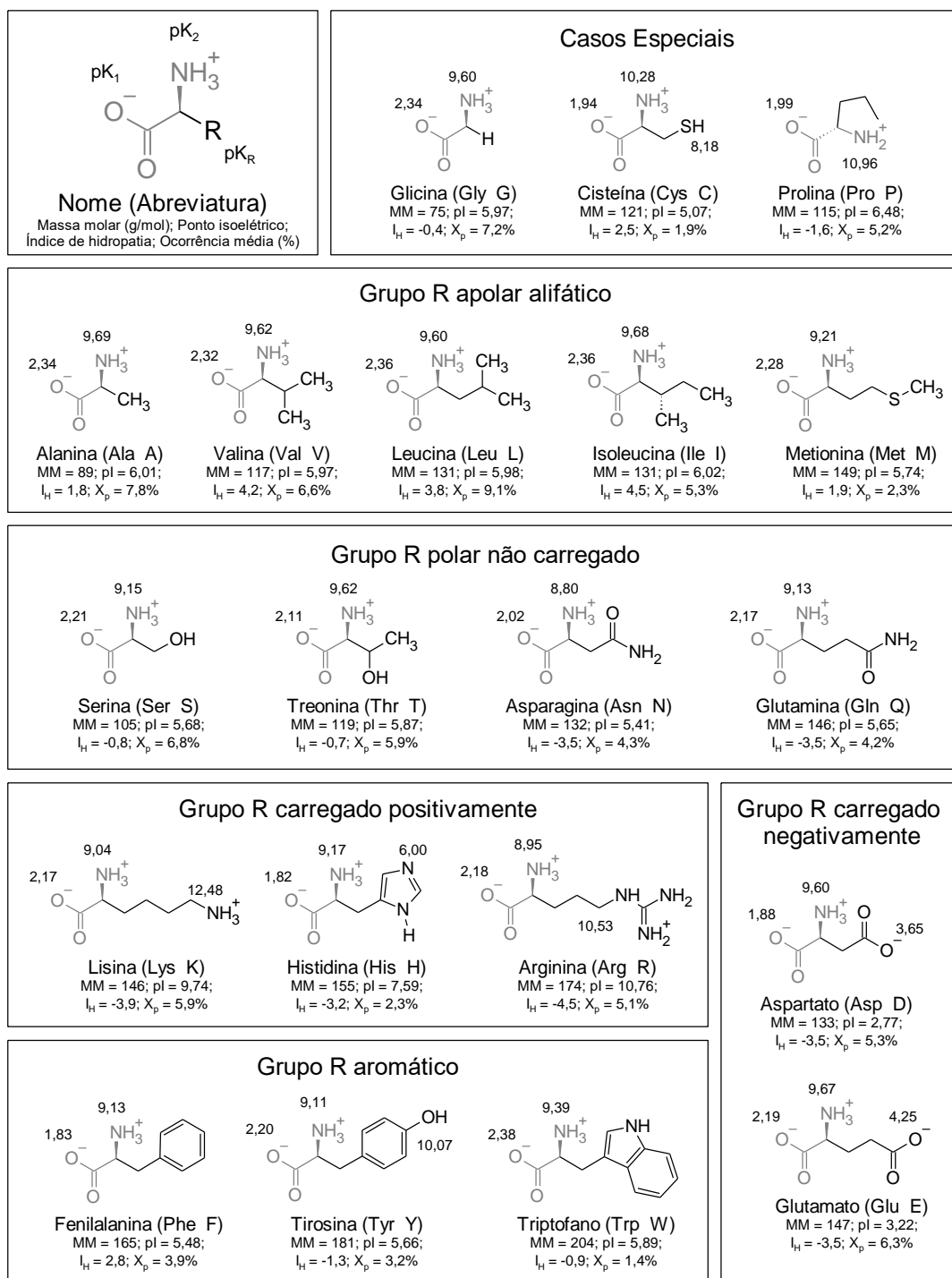


Figura 2.2 - Propriedades e convenções associadas a aminoácidos encontrados em proteínas. Estados de ionização estão em pH 7. pl = Ponto isoelétrico; MM = Massa molar; I_H = Índice de hidropatia; X_p = Ocorrência média em proteínas; e R = Grupo lateral. Adaptado de Nelson e Cox (2017) [46].

Por definição, aminoácidos são substâncias orgânicas que, assim como o nome indica, apresentam dois grupos funcionais distintos: um grupo carboxila ($-\text{COOH}$) e um grupo amina ($-\text{NH}_2$) [46–48]. A posição do grupo amina determina a configuração do aminoácido. Tem-se um α -aminoácido quando o grupo amina se encontra ligada ao carbono α . De forma análoga, quando este grupo está ligado ao carbono β , tem-se um β -aminoácido [46]. Além disso, essas substâncias também possuem um grupo lateral ($-\text{R}$) específico para cada tipo de aminoácido [46–48]. Com exceção da glicina, todos α -aminoácidos são moléculas quirais, ou seja, o carbono α é um centro quiral com quatro diferentes ligantes [46]. Embora existam aminoácidos estereoisômeros D, são os estereoisômeros L que formam os resíduos de aminoácidos presentes na grande maioria das proteínas [46].

Ligação peptídica é um tipo de ligação covalente que une dois aminoácidos a partir de uma reação de condensação. O grupo amina de um aminoácido reage com o grupo carboxílico de outro aminoácido, formando-se a ligação amida ($-\text{CO}-\text{NH}-$) e eliminando-se água (H_2O) no processo. O mecanismo da condensação de dois α -aminoácidos está representado na Figura 2.3.

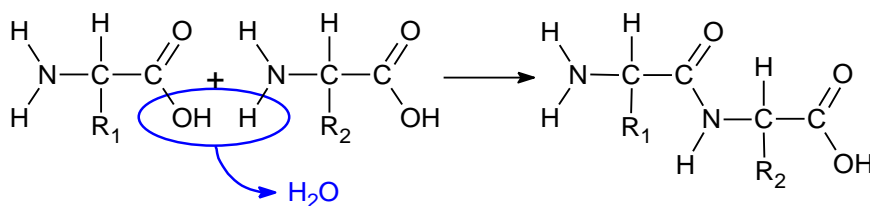


Figura 2.3 - Reação de condensação entre dois α -aminoácidos. R_1 e R_2 são os grupos laterais dos aminoácidos.

O resultado desta reação de condensação é um dipeptídeo formado por dois resíduos de aminoácido. Este tipo de reação pode continuar ocorrendo sucessivamente até a obtenção de uma macromolécula [46,47,49]. A ligação carbono-nitrogênio de uma ligação peptídica é excepcionalmente curta (1,32 Å em relação ao 1,47 Å de uma ligação C-N pura), e é estabilizada pelo fenômeno de ressonância como esquematizado na Figura 2.4.

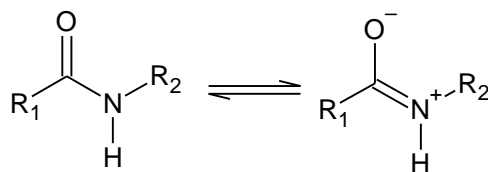


Figura 2.4 - Fenômeno de ressonância em uma ligação peptídica. R₁ e R₂ referem-se à continuação da cadeia peptídica.

O par de elétrons desemparelhados do átomo de nitrogênio pode ser doado ao carbono, deslocando os elétrons da dupla ligação do grupo carbonila (C=O) em direção ao oxigênio, formando-se um ânion oxigênio e um cátion nitrogênio [46,49]. Esta ressonância ajuda a aumentar a estabilidade da ligação peptídica e diminuir a rotação em torno dessa ligação. Portanto, as ligações peptídicas possuem um caráter acentuado de dupla ligação e conseqüentemente mantêm os seis átomos envolvidos em uma configuração essencialmente planar [46,49]. Esta característica tem implicações diretas na organização espacial das cadeias proteicas.

Proteína é uma poliamida formada pela união de α -aminoácidos. Os seres vivos sintetizam proteínas a partir de 20 α -aminoácidos distintos, já listados na Figura 2.2. É importante ressaltar que mais dois aminoácidos são sintetizados após a cadeia proteica estar completa: hidroxiprolina é sintetizada a partir da prolina; e cistina é sintetizada a partir da cisteína [46–49].

A cisteína é um caso especial quando se trata de aminoácidos. Primeiramente, seu índice de hidropatia (Apêndice A) é positivo, sendo que para aminoácidos polares este índice é negativo. Índice de hidropatia é uma escala que mede a hidrofobicidade ou hidrofiliabilidade do grupo lateral das proteínas, e indicam a energia livre (ΔG) da transferência do aminoácido de um solvente hidrofóbico para a água [46]. Assim, a transferência da cisteína de um ambiente apolar para um ambiente polar é um processo desfavorável, indicando o seu caráter hidrofóbico mesmo sendo uma molécula levemente polar [46]. Além disso, o grupo sulfidril da cisteína (–SH), também conhecido como tiol, é altamente reativo e tende a reagir com outro grupo sulfidril formando uma ligação dissulfeto (–S–S–), como mostrado na Figura 2.5. Essa ligação é de

extrema importância para a queratina e outras proteínas pois elas geram consequências diretas em sua conformação e estrutura tridimensional.

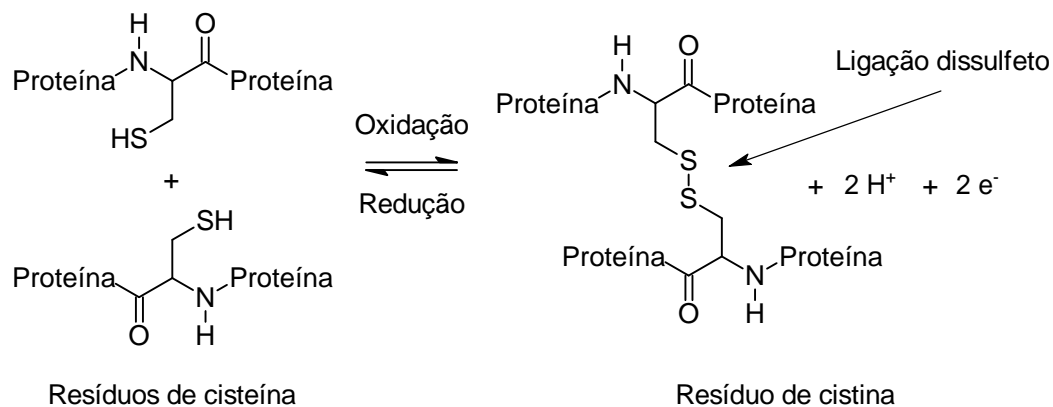


Figura 2.5 - Oxidação e redução de resíduos de cisteína em resíduo de cistina.

Outros casos especiais são os resíduos de glicina e prolina. A glicina apresenta apenas um átomo de hidrogênio como seu grupo lateral, permitindo assim uma maior flexibilidade em relação a outros aminoácidos com grupos laterais maiores. Devido à essa flexibilidade, a glicina é fundamental nas mudanças conformacionais da proteína, como as dobras [46]. A prolina, por outro lado, exerce uma influência profunda na conformação das proteínas devido a sua estrutura de anel rígida e ao potencial de isomerismo cis/trans [50].

A sequência de aminoácidos de uma cadeia proteica é denominada de estrutura primária. A conformação espacial da cadeia proteica determina a estrutura secundária, enquanto o enovelamento e dobramentos dessas estruturas é chamada de estrutura terciária. Por fim, se uma proteína for formada pela agregação de mais de uma cadeia proteica, a montagem espacial destas cadeias é a estrutura quaternária [46–49]. Representações genéricas dessas estruturas podem ser vistas na Figura 2.6.

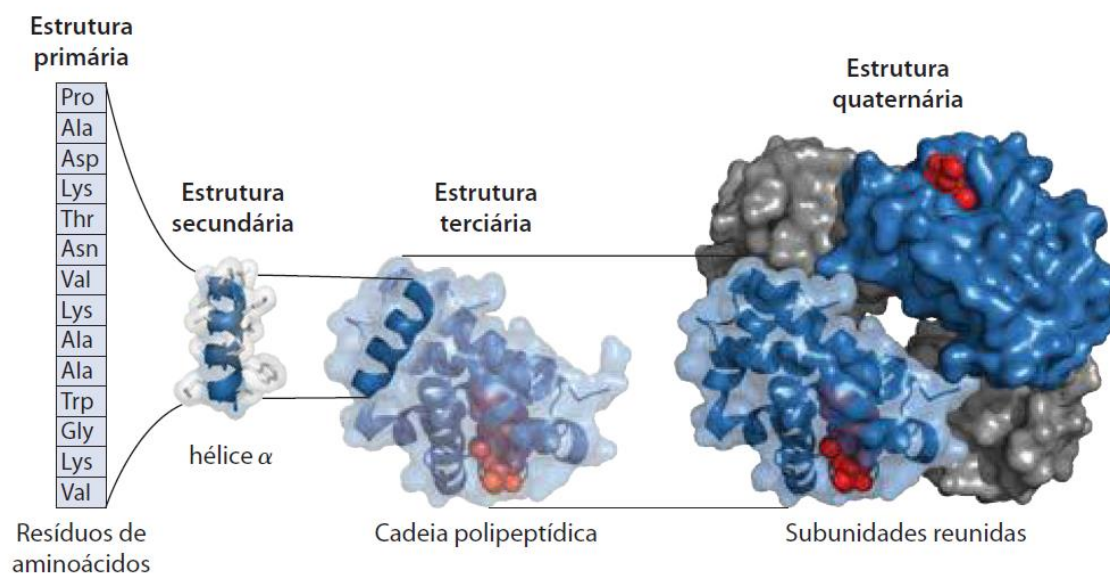


Figura 2.6 - Exemplos de diferentes níveis de estrutura nas proteínas [46].

As proteínas são encontradas essencialmente em dois tipos de estrutura secundária: hélice e folha pregueada (Figura 2.7) [51]. A estrutura em hélice ocorre quando os aminoácidos se organizam em uma espiral dextrogira em que cada grupo N-H da cadeia peptídica faz uma ligação de hidrogênio com um grupo C=O localizado a alguns resíduos de aminoácidos anteriores [46,52]. A hélice- α , estrutura em hélice mais comum em proteínas, ocorre quando esta ligação envolve quatro resíduos. Esta configuração permite que cada resíduo da cadeia corresponda a 100° de volta da hélice; portanto, cada volta completa necessita de 3,6 resíduos e 13 átomos [53,54]. Por esse motivo, a estrutura hélice- α também pode ser representada como hélice-3,6₁₃. A estrutura hélice- α possui um diâmetro entre 7 e 10 nm e em raríssimos casos é encontrada em rotação levogira [55,56]. A hélice-3₁₀ e a hélice- π são estruturas similares em que a ligação de hidrogênio acontece a cada 3 e 4,4 resíduos de aminoácidos, respectivamente [53]. É importante ressaltar que as cadeias laterais se encontram na direção normal ao eixo da estrutura de hélice, como pode ser observado na Figura 2.7a [57,58].

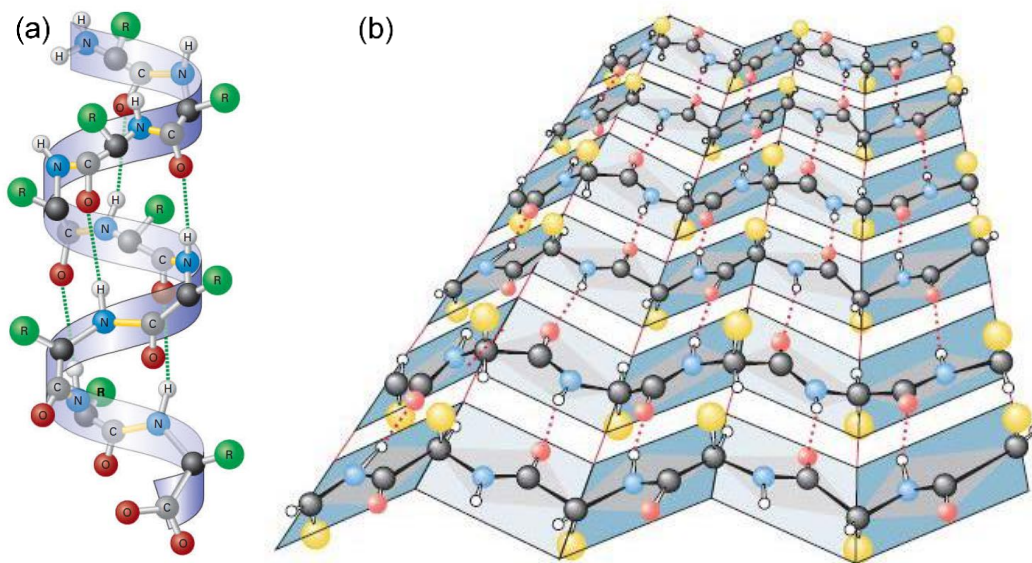


Figura 2.7 - Representação esquemática da estrutura (a) hélice- α ; e folha- β (antiparalela) [57,58].

A folha- β ocorre quando a cadeia peptídica é disposta de forma linear ao lado de outras. Devido a ressonância, a ligação peptídica é relativamente rígida e, conseqüentemente, os grupos laterais dos aminoácidos se encontram de forma alternada na cadeia peptídica para minimizar o efeito estérico [46]. Essas cadeias podem se orientar de forma paralela ou antiparalela, formando uma estrutura laminar com espessura de 3 a 4 nm, como ilustrado na Figura 2.7b [55,56].

Por fim, a terceira estrutura secundária mais comum em proteínas são as dobras. As dobras, assim como o nome diz, invertem a direção da cadeia polipeptídica permitindo a ligação de dois segmentos de hélice ou folha. A dobra- β é o tipo de dobra mais comum em proteínas e compreende a uma volta de 180° envolvendo 4 resíduos de aminoácido. Essa dobra se mantém estável por uma ligação de hidrogênio entre oxigênio da carboxila do primeiro resíduo com o H do grupo amina do quarto resíduo. Se o segundo resíduo for uma prolina, tem-se uma dobra- β do tipo I, enquanto se o terceiro resíduo for uma glicina, tem-se uma dobra- β do tipo II, como pode ser observado na Figura 2.8. Geralmente, as dobras são localizadas na superfície da proteína com a presença de resíduos polares e carregados superficiais.

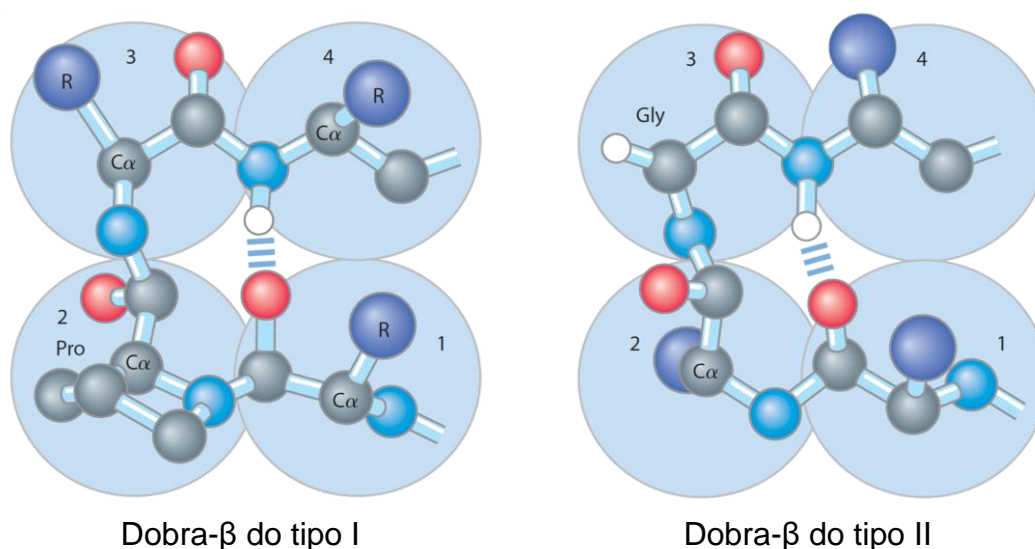


Figura 2.8 - Estruturas de dobras em proteínas. Dobras- β dos tipos I e II são as mais comuns. Adaptado de [46].

2.3 Precipitação de proteínas

Uma etapa importante quando se trabalha com proteínas é a sua purificação. A purificação de uma proteína envolve sua separação da solução em que ela se encontra e a remoção de possíveis impurezas. Essa etapa só é possível devido a diferença de solubilidade de proteínas individuais. A precipitação seletiva de proteínas é consequência direta da interação das cadeias proteicas e as características do meio em que se encontram, como pH, temperatura, concentração de íons (força iônica), constante dielétrica (polaridade), entre outros fatores [47].

As estabilidade e conformação das proteínas em meio aquoso podem ser afetadas pelo pH a depender da sua estrutura primária. O pH da solução causa a protonação ou desprotonação de grupos ionizáveis da proteína, o que causa a mudança de cargas de suas cadeias. Os pH em que essas mudanças acontecem para cada aminoácido estão detalhados na Figura 2.2. No ponto isoelétrico, a carga líquida da proteína é nula, o que permite que as moléculas se atraiam e se precipitem. Este fenômeno normalmente ocorre em pH baixo, o que significa que a adição de ácido pode ocasionar a precipitação da proteína [46–48]. Este

efeito é o mesmo utilizado na produção de queijo e coalhada, em que as proteínas do leite são coaguladas com a mudança de pH. A obtenção da proteína por esse método é chamada de precipitação isoelétrica. Uma esquematização da mudança de cargas de uma proteína em função do pH está representada na Figura 2.9.

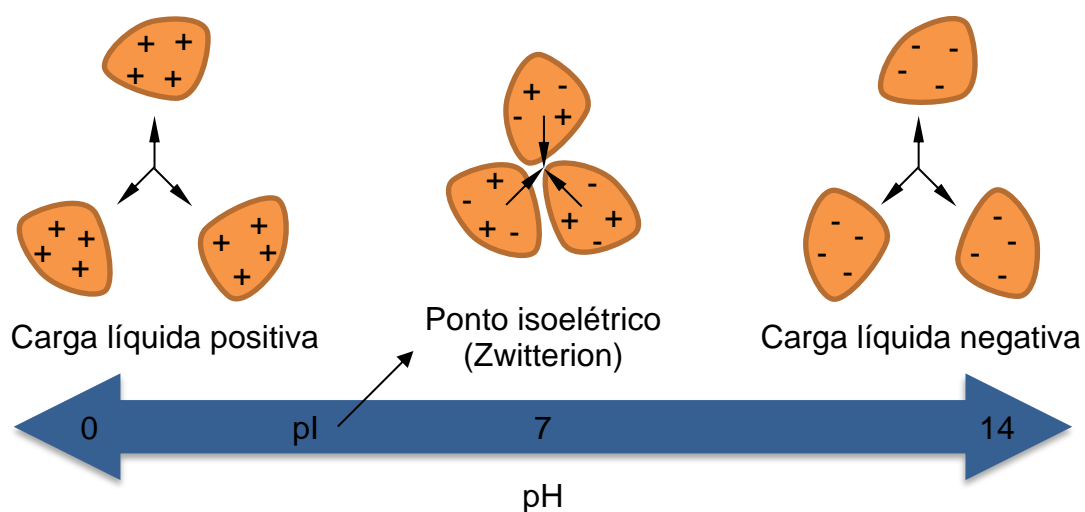


Figura 2.9 - Distribuição de cargas de uma proteína em função do pH.

A adição de sais à solução resulta no aumento da força iônica do meio, o que afeta diretamente a interação entre as proteínas e o solvente [59]. Assim, o aumento ou a diminuição da solubilidade das proteínas pode ser diretamente controlado pela quantidade de sal adicionado à solução [46]. A adição de pequenas quantidades de sal pode resultar no fenômeno conhecido como *salting in*, no qual os poucos íons presentes interagem com as cadeias proteicas, blindando a interação com outras moléculas e aumentando a solubilidade da proteína [46]. Por outro lado, a adição de grande quantidade de sal pode promover o fenômeno oposto, chamado de *salting out*. Nesse caso, a elevada concentração de sal aumenta significativamente a força iônica do sistema, resultando na solvatação dos íons pela água. Isso faz com que o solvente abandone as cadeias proteicas, que passam a interagir mais intensamente entre si, levando à precipitação [47]. O *salting out* pode ser utilizado para precipitar seletivamente as proteínas quando adicionado quantidades adequadas de sal.

Sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) é normalmente o sal de escolha para se precipitar proteínas [46], porém outros sais podem ser utilizados, como o sulfato de zinco (ZnSO_4) [34] e o cloreto de sódio (NaCl) [33,34]. A Figura 2.10 esquematiza o efeito de *salting in* e *salting out* em função da concentração de um sal genérico.

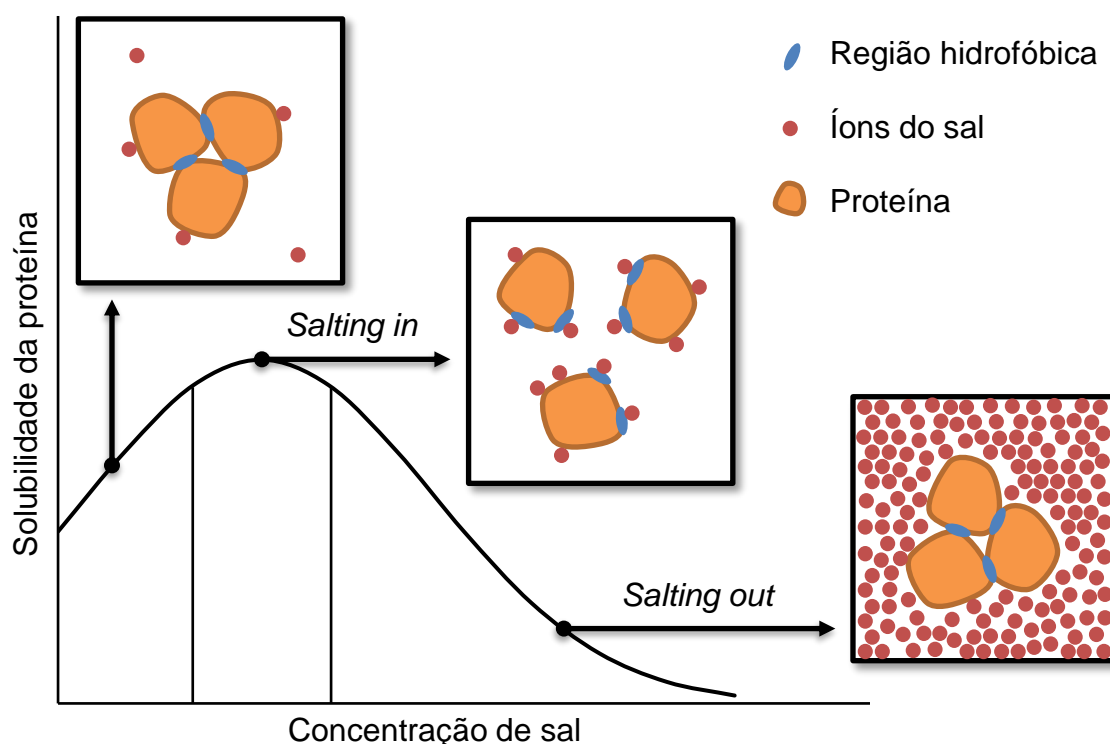


Figura 2.10 - Representação esquemática da solubilidade de proteínas em função da concentração de sal.

A precipitação por solvente orgânico, por outro lado, é causada devido à diminuição da constante dielétrica do sistema (ϵ_r), uma grandeza que, de certa forma, mede a capacidade de interação do solvente com o soluto. De acordo com a lei de Coulomb, a magnitude de uma força eletrostática entre duas cargas é inversamente proporcional a constante dielétrica do meio. Dessa forma, um meio de menor ϵ_r promove uma maior interação entre cargas. A água possui constante dielétrica de 80,4 em temperatura de 20 °C e pressão de 1 atm, enquanto outros solventes orgânicos possuem valores bem menores, como é o caso da acetona com constante dielétrica de 19,6 [60]. Assim, a adição de um solvente orgânico diminui a constante dielétrica da solução proteica, que, por sua

vez, aumenta a interação entre as superfícies carregadas das proteínas [33]. A maior interação entre cadeias proteicas causa a sua aglomeração e precipitação.

Outros métodos de precipitação também podem ser utilizados, como o aquecimento. Proteínas são sensíveis à temperatura, sendo facilmente susceptíveis a mudanças de conformação tridimensional que causam sua precipitação [46,48]. Esse tipo de precipitação geralmente não é empregado pois a desnaturação da proteína geralmente altera suas propriedades físicas e químicas e causa a perda de sua atividade biológica.

Crowell *et al.* (2013) pesquisaram a precipitação com acetona ($(\text{CH}_3)_2\text{CO}$) e cloreto de sódio (NaCl) de diversas proteínas, como a α -caseína e albumina de soro bovino (BSA) [33]. O estudo demonstrou que o aumento da força iônica da solução a partir da adição de acetona com pouco NaCl (1 a 100 mM) aumentou dramaticamente a precipitação das proteínas. A quantidade de sal necessário foi proporcional a quantidade de proteína em solução, assim como sua carga e a constante dielétrica da solução. Os pesquisadores aumentaram a precipitação de BSA em solução de 80% (v/v) de acetona de 15% para praticamente uma recuperação quantitativa ($\approx 100\%$) com o uso de apenas 1 mM de NaCl. É importante destacar que essa quantidade de sal foi 3 ordens de grandeza inferior do que a convencionalmente empregada em *salting out* (3 M).

O fenômeno descrito acima foi observado por Baghalabadi e Doucette (2020) para a precipitação de peptídeos de baixa massa molar (<10 kDa) com solução de acetona 80% (v/v) e adição de sal [34]. Os peptídeos foram obtidos pela digestão de proteínas (levedura, salmão e BSA) pelas enzimas tripsina e pepsina. A adição de 100 mM de ZnSO_4 foi suficiente para se ter uma recuperação quantitativa de peptídeos em solução de acetona. Este método também foi capaz de precipitar moléculas de massa molar tão pequenas quanto 1 kDa. Portanto, o efeito sinérgico resultante da adição de solvente orgânico e sal simultaneamente atua como uma ferramenta poderosa para a precipitação de proteínas. Neste trabalho, a precipitação com acetona e NaCl foram empregadas separadamente de forma a avaliar seus potenciais isolados quanto a eficiência no processo de recuperação da queratina, seus ecoindicadores e as propriedades dos filmes plásticos obtidos.

2.4 Pena de frango e resíduo da indústria avícola

Alguns setores industriais produzem grandes quantidades de resíduos ricos em proteína. No Brasil, destaca-se a produção de carne de frango que tem como subproduto as penas do animal. Cada frango possui aproximadamente entre 5 e 7% de sua massa em penas [6] que é um tecido composto por aproximadamente 90% de queratina [32,61,62]. Somente em 2021, foram produzidas mais de 14 milhões de toneladas de carne de frango pela indústria avícola, segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) [63]. A Figura 2.11 mostra a tendência de crescimento da produção de carne de frango no Brasil desde 1997 até 2021.

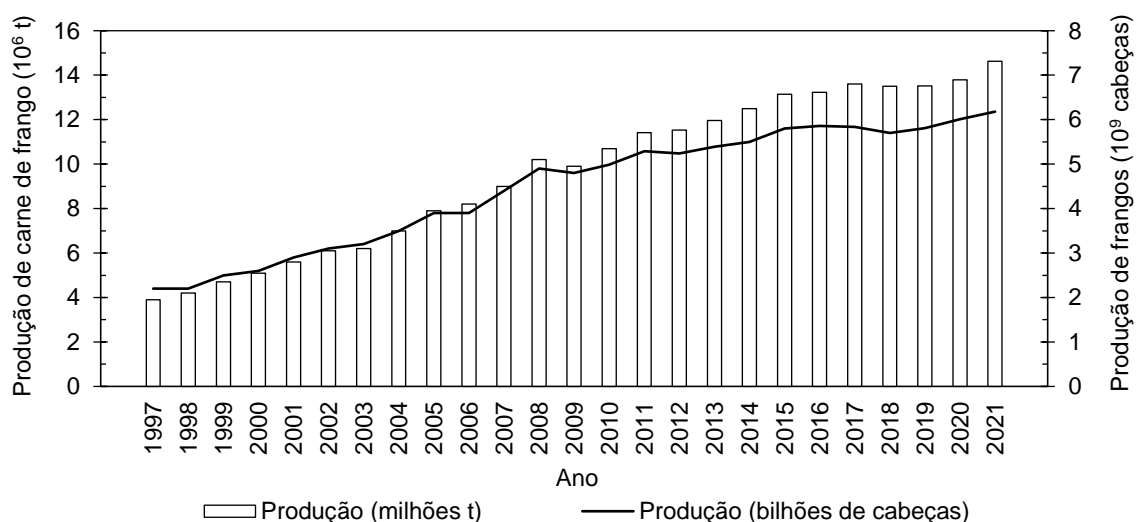


Figura 2.11 - Produção histórica de carne de frango no Brasil. Baseado em números do IBGE 2012 e 2021 [64,65].

O crescimento da produção de frangos não é uma tendência exclusiva do Brasil. De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), a produção mundial aumentou de 100 Mt em 2010 para 135 Mt em 2020 [1,2]. Esta tendência de crescimento da produção vem atendendo uma demanda crescente por proteína animal. O consumo de carne de frango está estimado em mais de 150 Mt em 2031 devido ao seu menor custo e alta razão proteína/gordura em relação a outros produtos [3]. Este crescimento de

consumo equivalerá a quase metade do crescimento no consumo de carne mundial no período [3]. Devido a abundância de penas de frango gerada pela indústria avícola, aliado à grande resistência química e o risco de patógenos, o descarte do resíduo de pena de frango levanta preocupações sérias para a saúde ambiental e humana [4,5].

Os resíduos de penas de frango geralmente são destinados a aterros sanitários ou usinas de incineração, no entanto, ambas as opções apresentam impactos ambientais negativos significativos [31,66]. Atualmente, as principais indústrias de processamento de frango estão adotando alternativas mais rentáveis para o reaproveitamento dos resíduos de penas. Uma prática comum é a produção de farinha de pena, em que as penas são submetidas à hidrólise e misturadas a outros subprodutos da indústria, como sangue [10,67]. Essa mistura se torna uma fonte de aminoácidos e peptídeos de baixo custo para a alimentação de outros animais, porém a farinha de pena é de baixa digestibilidade e desbalanceada em nutrientes [31,68]. Existem ainda alguns estudos sobre a compostagem [32,69] e a produção de fertilizantes a partir do resíduo de pena [68,70,71]. Assim, o reaproveitamento e valorização das penas de frango ainda é um tópico em aberto para a indústria, sendo necessário buscar formas inovadoras para reduzir o impacto ambiental negativo decorrente do descarte das penas de frango.

A retirada das penas de frango é iniciada através do processo de escaldagem, que consiste em imergir ou aspergir água morna na carcaça do animal após a sangria. Nessa etapa, a água tem a função de eriçar as penas e permitir que o calor seja transferido aos folículos, facilitando a remoção. Em seguida, o animal é destinado a uma máquina depenadora de aves, em que dedos de borracha são usados para remover as penas. Este processo de remoção gera um resíduo úmido de pena normalmente contaminado com outras estruturas, como detritos de solo, sangue, pele e outros tecidos fragmentados do animal. A Figura 2.12 mostra uma amostra de resíduo de pena de frango coletado logo após a sua remoção.

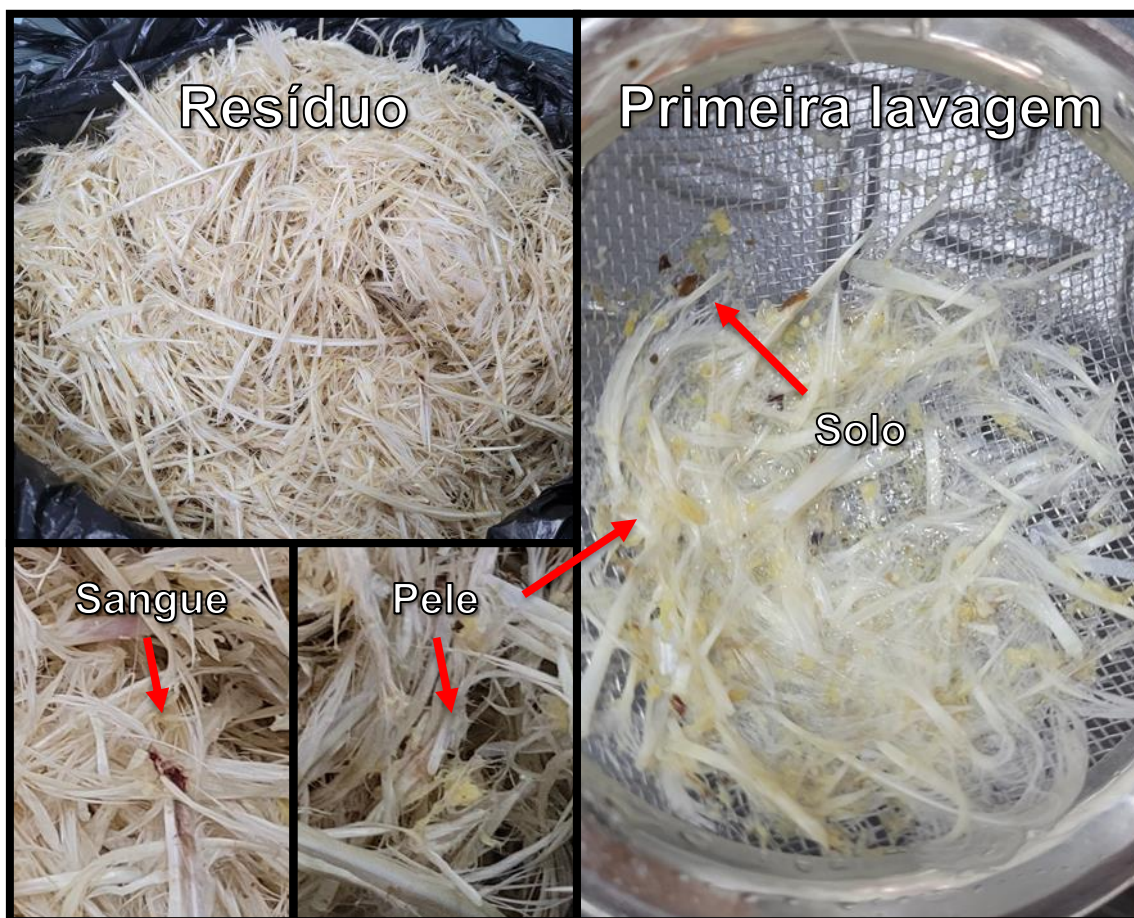


Figura 2.12 - Aparência e contaminações do resíduo industrial de pena de frango logo após a sua remoção do animal e primeira lavagem.

Para valorizar as penas de frango, o resíduo precisa ser primeiramente tratado. O pré-tratamento do resíduo de pena de frango geralmente envolve 4 etapas: limpeza, desengorduramento, sanitização e trituração. As etapas de limpeza e desengorduramento são fundamentais para remover solúveis e detritos sólidos, como partículas de solo, gordura e sangue. Já a sanitização é essencial para eliminar os micro-organismos presentes no resíduo, garantindo a segurança de seu manuseio. Por fim, as penas geralmente são trituradas para facilitar a compactação e manejo do material. A trituração é essencial para a posterior extração da queratina, pois um tamanho de partícula menor proporciona uma área superficial específica maior, o que aumenta o contato com os reagentes de extração. É importante destacar ainda que partículas muito

pequenas tendem a se aglomerar, dificultando, assim, a extração de queratina [72].

Pourjavaheri *et al.* (2015) estudaram os efeitos de diversos tipos de pré-tratamento em pena de frango com o objetivo de reduzir a quantidade de bactérias e gordura presentes no material [73]. O grupo confirmou que a extração Soxhlet utilizando etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-OH}$) durante 5 horas foi o pré-tratamento mais simples e indicado para a remoção de gordura, destruição de salmonela e menor contagem de outros micro-organismos após incubação. A eficiência da remoção de gordura foi comprovada com a técnica de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) operando no modo de reflexão total atenuada (ATR). A banda referente ao estiramento da vibração C=O em 1710 cm^{-1} , associada a ésteres presentes na gordura, mostrou-se ausente nos espectros de FTIR-ATR após o tratamento. Foi concluído ainda que a combinação de métodos de purificação com o surfactante dodecilsulfato de sódio (SDS, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3^-\text{Na}^+$), o oxidante dióxido de cloro (ClO_2) e o solvente etanol obteve resultados de limpeza semelhantes ao pré-tratamento utilizando apenas etanol. A combinação desses pré-tratamentos ainda resultou em penas com propriedades mecânicas superiores.

O resíduo de pena de frango contém diversas impurezas que prejudicam a homogeneidade do material de trabalho, entretanto as penas de frango por si só também possuem diferenças significativas que deixam o seu estudo ainda mais complexo. A pena de uma ave é composta por estruturas chamadas de cálam, raque, barbas e bárbulas [73]. O cálam é uma estrutura tubular oca na base da pena que se insere na pele da ave [24]. A raque é o eixo principal da pena, a partir do qual partem uma série de ramificações conhecidas como barbas [24]. As barbas, por sua vez, também possuem ramificações denominadas bárbulas. As bárbulas têm a capacidade de se conectar umas às outras por meio de pequenos ganchos, garantindo que as barbas fiquem entrelaçadas e mantenham o formato característico da pena [74–76].

Cada parte do corpo da ave pode produzir penas com funções específicas. As penas das aves podem ser categorizadas em diferentes tipos: penas de contorno, plúmulas, semiplumas e cerdas. As penas de contorno

referem-se às penas típicas que compõem o corpo da ave, incluindo as penas de voo (rêmiges) e as penas da cauda (rectrizes). Por outro lado, as plúmulas são penas pequenas e macias abaixo das penas de contorno e têm a função de fornecer isolamento térmico. Um tipo específico de plúmula é a filopluma de função sensorial. As semiplumas também tem papel de isolar termicamente a ave e são localizadas entre as penas de contorno e as plúmulas. Por fim, as cerdas são penas sem barbas e, assim como as filopluma, também possuem função sensitiva. Os tipos de pena e as denominações de suas estruturas podem ser vistas na Figura 2.13.

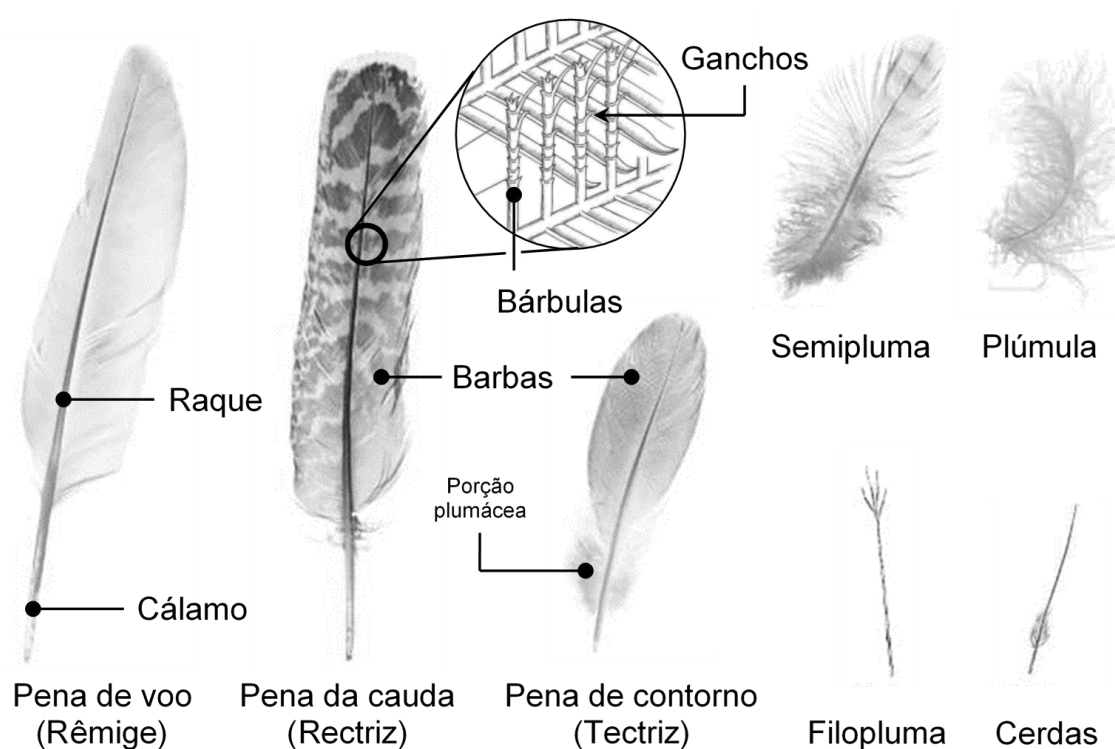


Figura 2.13 - Tipos de penas e suas estruturas. Imagem adaptada de Baron, J. R. (2018) [77].

As penas de frango variam não somente em formato e subestrutura, mas também em composição de aminoácidos. Emmi-Maria Nuutinen (2017) mediu a composição de aminoácidos de penas de frango inteiras, assim como da raque e das barbas separadamente [78]. Penas de frango foram hidrolisadas em ácido clorídrico 6 M e analisadas por cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC).

Os resultados encontrados estão listados na Tabela 2.1 e é possível observar que as penas de frango são ricas em serina, prolina, ácido glutâmico, cisteína, leucina e valina, sendo os três primeiros sempre reportados em maior concentração na literatura. A pesquisadora encontrou uma fração mássica de 8,2 e 9,4% de cisteína para a raque e a barba, respectivamente, valores muito maiores que a média das proteínas (1,9%, Figura 2.2) [46]. Por outro lado, tirosina, lisina, histidina e metionina estão em menor concentração. Uma análise realizada por Harrap e Woods (1964) em penas da asa de um frango da raça Leghorn (*Gallus gallus domesticus*) também concluiu uma concentração baixa de triptofano. Esse aminoácido geralmente é quebrado durante a hidrólise ácida e precisa ser medido por outros métodos [79]. A composição da pena de frango mostra uma maior quantidade de aminoácidos apolares do que polares, entre 50 e 60%, o que colabora com a hidrofobicidade da queratina em relação a outras proteínas [80,81]. A alta proporção de aminoácidos hidrofóbicos [78] e geometria ramificada distinta [82], assim como a presença de gordura na superfície, tornam a pena de frango um tecido altamente resistente à água. A estrutura de barbas e bárbulas minimizam o contato de líquidos com a queratina, aumentando assim o efeito hidrofóbico [83]. Sun et al., 2020 observaram um ângulo de contato com água de 138° para penas de frango não desengorduradas [84].

A raque e as barbas das penas, de maneira simplificada, são compostas pelo córtex e pela medula. O córtex é formado por fibras radiais em sua porção mais externa e por fibras longitudinais à medida em que se avança em profundidade [85]. Estas fibras são englobadas por uma matriz amorfa de queratina. A medula, entretanto, compreende a parte mais interna da pena e é constituída de estruturas poliédricas preenchidas com ar [74,76]. Esta composição, representada na Figura 2.14, faz da pena uma estrutura leve e de elevada resistência à tração e flexão, sendo altamente adaptada para suportar forças aerodinâmicas e permitir o voo.

Tabela 2.1 - Teor de aminoácidos das penas de frango e suas subestruturas em porcentagens proporcionais (% total AA) [36,78].

Aminoácido	Pena	Raque	Barbas
Casos Especiais			
Glicina (Gly, G)	6,7	8,2	6,7
Prolina (Pro, P)	10,1	9,7	10,4
Cisteína (Cys, C) ^c	8,8	8,2	9,4
Grupo R apolar alifático			
Alanina (Ala, A)	3,8	5,8	3,6
Valina (Val, V)	7,3	7,7	7,5
Leucina (Leu, L)	8,4	10,0	8,1
Isoleucina (Ile, I)	4,7	3,8	4,7
Metionina (Met, M) ^c	0,6	0,4	0,5
Grupo R aromático			
Fenilalanina (Phe, F)	5,3	5,5	5,3
Tirosina (Tyr, Y) ^c	2,4	1,6	2,3
Triptofano (Trp, W) ^b	-	-	-
Grupo R polar não carregado			
Serina (Ser, S)	12,7	12,3	12,7
Treonina (Thr, T)	4,6	4,0	4,7
Asparagina (Asn, N)	-	-	-
Glutamina (Gln, Q)	-	-	-
Grupo R carregado positivamente			
Lisina (Lys, K)	1,2	0,6	0,9
Histidina (His, H)	0,5	0,3	0,4
Arginina (Arg, R)	6,6	5,8	6,4
Grupo R carregado negativamente			
Aspartato (Asp, D) ^a	6,1	6,5	6,2
Glutamato (Glu, E) ^a	10,4	9,6	10,3

^a Asparagina e glutamina são convertidas em ácido aspártico e ácido glutâmico, respectivamente;

^b Triptofano é completamente destruído durante a hidrólise ácida;

^c Metionina, cisteína e tirosina sofrem degradação parcial.

Essa estrutura compacta de fibras também contribui para a resistência química da pena de frango, pois o solvente tem dificuldade de penetrar na microestrutura do material. Embora a pena de frango possua maior fração de folha- β , a estrutura de hélice- α ainda pode ser encontrada em algumas regiões da pena, principalmente nas fibras das barbas e das bárbulas [9].

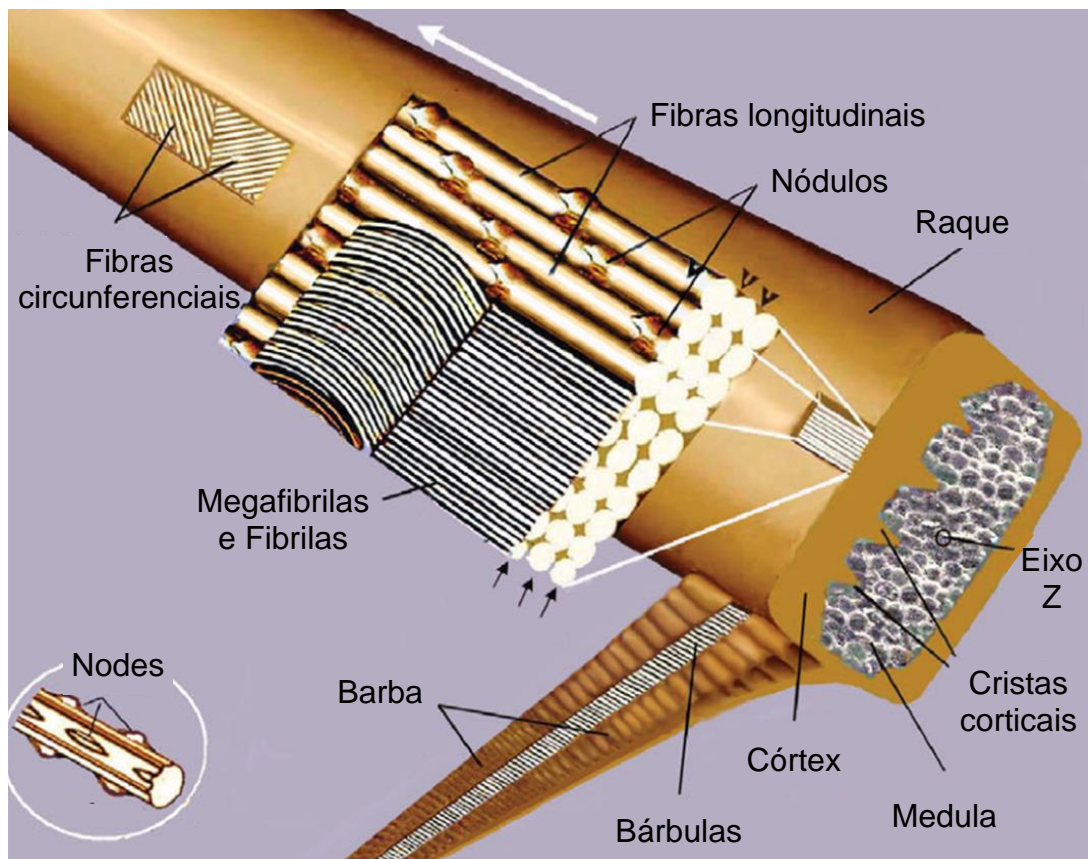


Figura 2.14 - Visão esquemática da microestrutura e morfologia da pena de frango [74,86].

2.5 Queratina

A queratina é uma proteína fibrosa rica em resíduos de cisteína em comparação com outras proteínas [87]. Estes resíduos são facilmente oxidados em cistina, resíduos que contêm uma ligação dissulfeto que atua como ligação cruzada intramolecular ou intermolecular [24]. Essas ligações dissulfeto aliadas às ligações de hidrogênio, interações de van der Waals e iônicas são responsáveis pela elevada estabilidade química e resistência mecânica da queratina [13,51,62]. Essas interações estão esquematizadas na Figura 2.15.

A queratina é encontrada em animais e compõem diversas estruturas do organismo, geralmente tecidos externos como pelos, penas, unhas, chifres, cascos, escamas, entre outros [24,55,88,89]. Dependendo de sua origem, esta

macromolécula apresenta variações significativas em diversos aspectos, como a composição de aminoácidos e estrutura secundária. Essas variações conferem à queratina uma ampla gama de funções, desde o alto isolamento térmico de pelos e penas [27] até a elevada absorção de impacto de cascos e chifres [76].

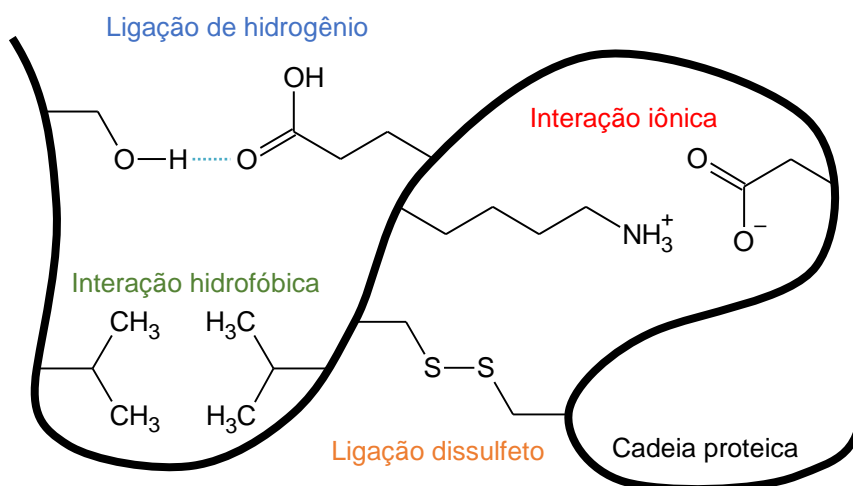


Figura 2.15 - Exemplos de interação química presente na queratina.

Além das diversas interações químicas da queratina, os materiais queratinosos geralmente são altamente reticulados e organizados em uma estrutura compacta de microfibrila [32]. Essas microfibrilas são formadas por diversos filamentos intermediários compostos de estruturas hélice- α ou folha- β organizadas, como esquematizado na Figura 2.16. Esta configuração permite uma elevada resistência à solubilização da queratina por ácidos ou bases fracos e diversos solventes orgânicos [13,32]. Portanto, para se solubilizar esta proteína, é necessário quebrar a estrutura compacta de fibras e romper as interações físicas e ligações químicas entre as cadeias peptídicas, incluindo as ligações dissulfeto.

2.6 Metodologias de extração de queratina

Estudos sobre a extração de queratina não são recentes. Após um progresso significativo na década de 1950, quando as queratinas solúveis de lã de ovelha e pena de frango foram isoladas com sucesso, houve um aumento no

número de pesquisas, sendo desenvolvidos vários métodos para se obter essa proteína tão versátil [79]. Os métodos químicos são os mais explorados na literatura, em especial a extração por meio da redução, oxidação e sulfitolise da ligação dissulfeto, ou ainda a hidrólise alcalina da cadeia peptídica.

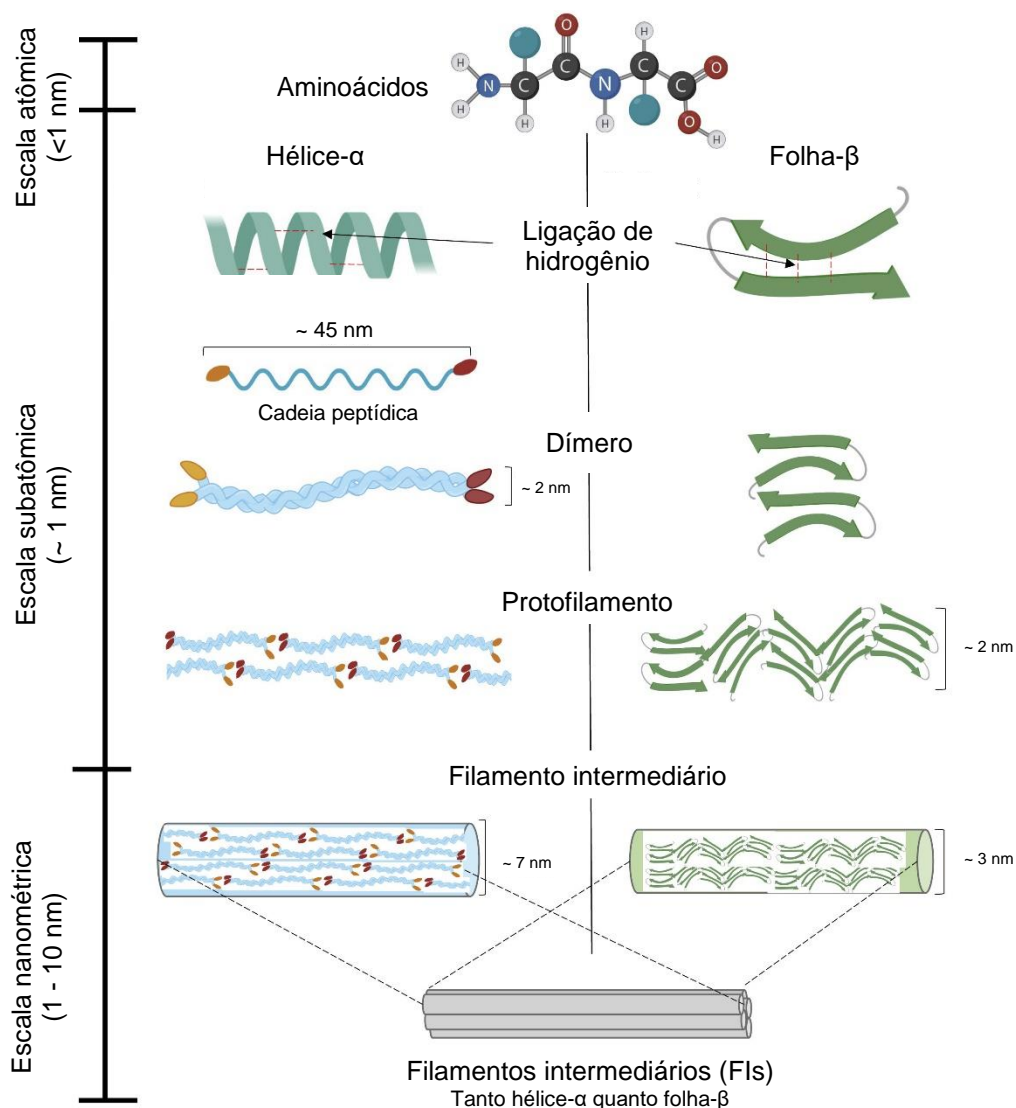


Figura 2.16 - Evolução da microestrutura dos tecidos de queratina desde a escala atômica até a formação de filamentos intermediários [90].

No método de redução, as ligações dissulfeto são quebradas em resíduos de cisteína a partir de um agente redutor, sendo normalmente um composto contendo um grupo sulfidril [91], como esquematizado genericamente na Figura

2.17. Para permitir a entrada do agente redutor, o método de redução geralmente é realizado em soluções concentradas de ureia, acima de 4 M [92]. A ureia é um agente desnaturante de proteína e atua diretamente na quebra das ligações de hidrogênio, permitindo o inchamento da queratina e a difusão do agente redutor em sua estrutura fibrilar [13,17]. Outros agentes desnaturantes também já foram utilizados para se extrair queratina, como tioureia ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$) [21,93] e cloreto de guanidina ($\text{CH}_5\text{N}_3\cdot\text{HCl}$) [89,93].

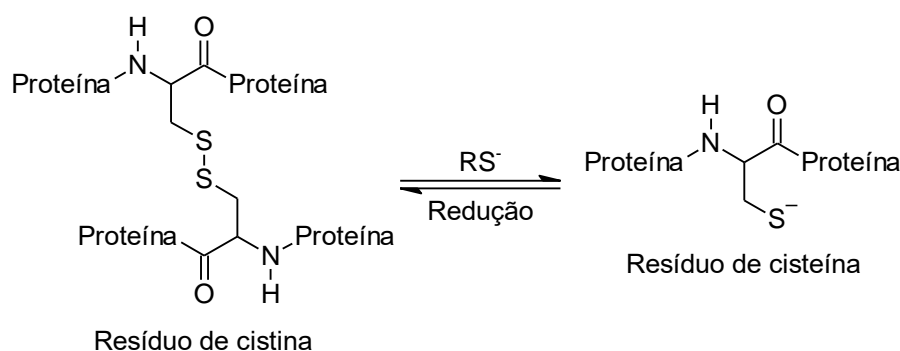


Figura 2.17 - Reação genérica da redução da ligação dissulfeto.

O ácido tioglicólico (HSCH_2COOH) e o 2-mercaptoetanol ($\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$) foram reagentes redutores historicamente utilizados para se extrair queratina [94,95]. Sulfeto de sódio (Na_2S) também foi amplamente empregado para se quebrar ligações dissulfeto [9,96,97], principalmente na remoção de pelos no curtimento do couro [98]. Entretanto, esses reagentes são caros e/ou altamente tóxicos e corrosivos, o que incentivou a procura de novas tecnologias mais amigáveis ao meio ambiente [99]. O desenvolvimento de uma metodologia recente foi o uso do próprio aminoácido L-cisteína como agente redutor [61,99]. Além de ter baixo custo, a L-cisteína não quebra a cadeia peptídica da proteína.

A reação da queratina com o reagente contendo o grupo sulfidril resulta na conversão de resíduos de cistina em resíduos de cisteína. Após a quebra das ligações dissulfeto, muitos autores denominam o produto como querateína. Os resíduos de cisteína podem ser facilmente convertidos novamente em cistina na ausência do redutor e desnaturante, o que causa a perda de solubilidade e, possivelmente, a precipitação da proteína. Surfactantes, como o dodecilsulfato de sódio, são utilizados para prevenir a reoxidação dos resíduos de cisteína e

estabilizar as cadeias de queratina, principalmente quando se utilizada uma recuperação por diálise [100]. Outra maneira de se evitar a reoxidação do grupo sulfidril, embora não muito utilizada, é a modificação química com substâncias como o ácido iodoacético, iodoacetamida e N-etilmaleimida [94,101]. Além disso, o grupo sulfidril também se reoxida com facilidade em presença de ar. Por esse motivo, muitos pesquisadores utilizam um gás inerte, normalmente gás nitrogênio (N₂), como substituto do ar durante a extração [92,100,102]. Porém, esse procedimento, além de mais complexo, envolve equipamentos mais sofisticados e não evita a auto-oxidação causada por traços de impurezas na solução. Infelizmente, o resultado desta prática é amostras de queratina solúvel com composições inconsistentes [13].

Wang *et al.* (2016) extraiu queratina de lã de ovelha utilizando uma solução de 0,165 M de L-cisteína e 8 M de ureia em pH de 10,5 por 5 horas em temperatura de 75 °C [99]. A proteína foi isolada por diálise seguido de precipitação isoelétrica e liofilização do precipitado, recuperando em torno de 72% de queratina sem alteração significativa de massa molar. Os autores observaram uma mudança nas frações de estruturas secundárias da queratina, com perda hélice- α e ganho de folha- β . Durante a extração, a estrutura hélice- α é destruída e não recuperada após a precipitação.

Pourjavaheri, *et al.* (2019) utilizou um procedimento muito semelhante para se extrair queratina de pena de frango [9]. A mesma solução foi utilizada para solubilizar a pena por 6 horas em temperatura de 40 °C. A queratina foi precipitada com HCl, lavada com água e secada em estufa. Os pesquisadores obtiveram um rendimento de 66% de queratina com massa molar preservada. Entretanto, análises termogravimétricas mostraram que a queratina apresentou uma perda de massa adicional antes da temperatura de degradação da proteína. Essa perda de massa foi atribuída a impureza de ureia incorporada na queratina, mesmo após a sua lavagem.

A extração da queratina também pode ser realizada por meio de processos oxidativos, em que os resíduos de cistina são oxidados em grupos sulfônicos (-SO₃H), ou seja, um resíduo de ácido cisteico, como demonstrado na Figura 2.18 [103–105]. Alguns autores mencionam que a oxidação da ligação

dissulfeto ocorre com a formação de grupos sulfênicos ($-\text{SOH}$) e sulfínicos ($-\text{SO}_2\text{H}$) como intermediários [106–108]. Os reagentes mais empregados para se oxidar as ligações dissulfeto são peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido peracético ($\text{CH}_3\text{COO}-\text{OH}$), ácido perfórmico ($\text{HCOO}-\text{OH}$), hipoclorito de sódio (NaClO) e permanganato de potássio (KMnO_4) [29,32,109]. O produto da reação de oxidação é denominado queratose, uma macromolécula mais polar do que a queratina devido à presença dos grupos sulfônicos [32]. Além disso, a oxidação da cistina é considerada uma reação irreversível [110,111]. Os grupos sulfônicos são estáveis em água, o que significa que a queratina tem mais facilidade de se manter solúvel, não necessitando assim da adição de surfactante, como é o caso do método de redução.

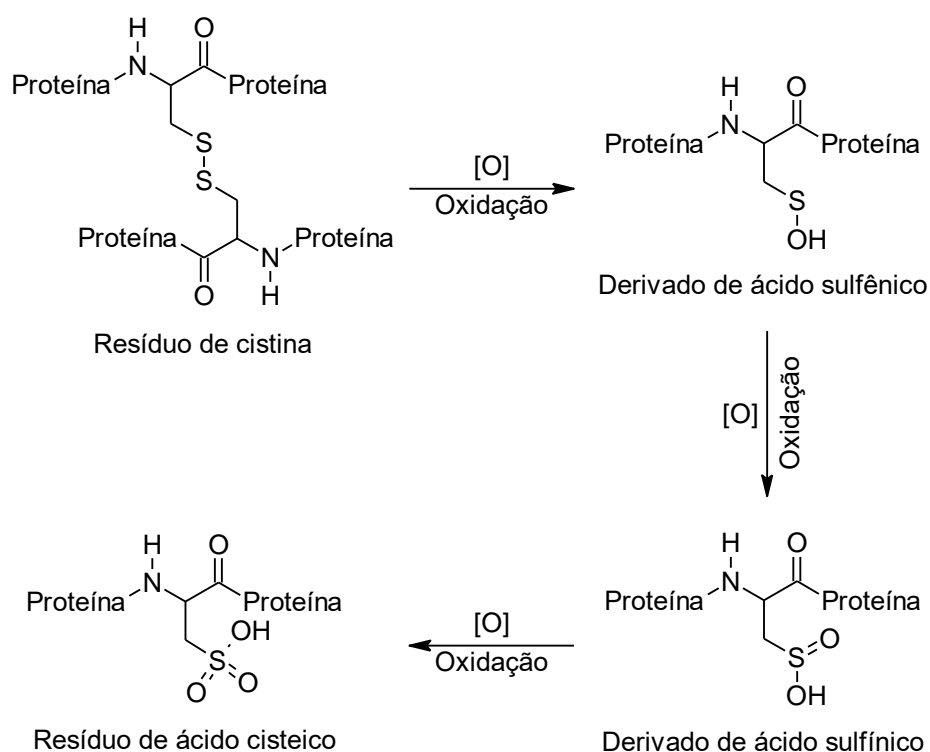


Figura 2.18 - Reação genérica de oxidação da ligação dissulfeto.

As extrações de queratina por oxidação datam desde a década de 50, quando Earland e Knight (1955) oxidaram lã de ovelha com ácido peracético na concentração de 2% (v/v) por 30 horas a 18 °C, seguido da solubilização em solução branda de 0,2 N de amônio (NH_4OH) [112]. Esta metodologia foi

baseada em trabalhos anteriores sobre insulina, hormônio que contém cisteína, os quais demonstraram que o ácido peracético ataca os resíduos de cisteína de forma específica. Em 1977, Buchanan extraiu queratina de cabelo pelo método oxidativo [113]. Foi empregado uma solução de ácido perbórico na concentração de 2,5% (v/v) a 4 °C por 18 horas. Este método foi capaz de extrair apenas 6% de queratina.

De maneira geral, as extrações de oxidação demandam longos períodos de reação para solubilizar uma pequena quantidade de queratina solúvel. Nos estudos de Sierpinski *et al.* (2008) com cabelo, os autores afirmam que o uso exclusivo do agente oxidante permite apenas o inchamento da camada mais externa do tecido queratinoso (cutícula) e a conversão das ligações dissulfeto presentes no interior (medula) [114]. Contudo, essa conversão isoladamente não é capaz de solubilizar completamente a queratina. Alguns trabalhos utilizam o auxílio de uma solução alcalina para aumentar o rendimento da reação [113,115], entretanto é necessário tomar cuidado com a concentração para não ocorrer a diminuição significativa da massa molar da queratina. Utilizando uma solução de ácido peracético concentrada (24% v/v) por 48 horas seguido de solubilização em solução de TRIS na concentração de 100 mM, Shavandi *et al.* (2017) atingiu rendimentos de até 55% de queratina solúvel com cadeia polimérica preservada [115]. É importante ressaltar que, assim como os agentes redutores, a maioria dos agentes oxidantes são tóxicos e perigosos de se trabalhar em grande volume. Outro ponto de destaque referente a queratina é que a oxidação do material também pode ocorrer naturalmente, por exposição à radiação ultravioleta (UV), por exemplo [116].

A reação de sulfitólise é a quebra da ligação dissulfeto da proteína e a formação de um resíduo de cisteína (querateína) e um resíduo de S-sulfocisteína, ou sal de *Bunte* ($-S-SO_3^-$), como representado na Figura 2.19 [117]. O produto da sulfitólise da queratina é normalmente denominado de S-sulfoqueratina (*S-sulfo keratin*), em referência ao resíduo de cisteína sulfonado [118]. Essa queratina ainda apresenta solubilidade instável devido a presença de grupos sulfidrilas reativos que não foram oxidados. Tais grupos podem se reoxidar novamente em ligações cruzadas, permitindo a

aglomeração das cadeias de queratina. Dessa forma, muitos artigos ainda utilizam um surfactante para estabilizar a proteína em solução durante a extração e recuperação.

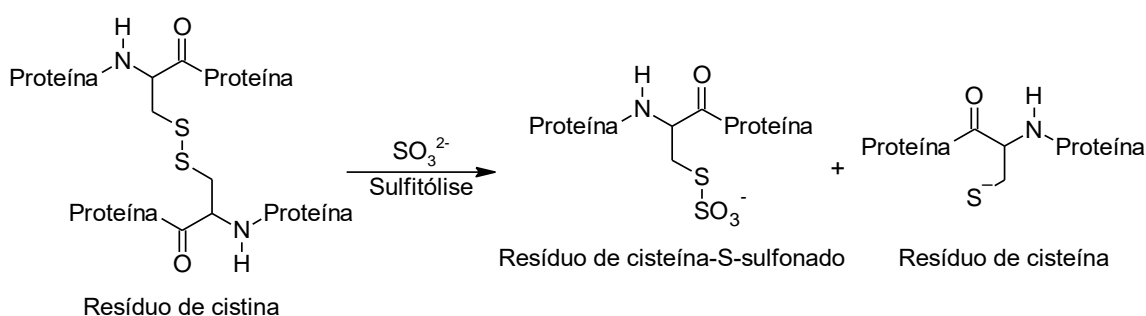


Figura 2.19 - Reação genérica de sulfitólise da ligação dissulfeto.

Katoh *et al.* (2004) extraíram queratina de lã de ovelha utilizando uma solução de 0,5 M de metabissulfito de sódio, 8 M de ureia e 0,06 M de SDS [118]. Embora a extração tenha sido realizada em alta temperatura (100°C), foi utilizado um tempo relativamente curto de 30 minutos, o qual permitiu a obtenção de queratina praticamente preservada. Esta queratina foi utilizada para se produzir *scaffolds* através de prensagem a quente em temperatura de 140 °C e pressão máxima de 20 MPa por 10 min. As esponjas se mostraram insolúveis em água, característica desejável em diversos plásticos biodegradáveis de fonte natural, como aqueles a base de amido e pectina.

Queratina de pena de frango foi extraída por Ayutthaya *et al.* (2015) por meio da sulfitólise utilizando uma solução de metabissulfito de sódio, 8 M de ureia e 0,06 M de SDS a 65 °C por 5 horas [30]. A recuperação foi feita em 3 dias por diálise, seguido de liofilização. Os pesquisadores obtiveram um rendimento máximo de 87,6% para uma concentração de 0,2 M de agente redutor. Entretanto, esse rendimento caiu para 60,2% com o aumento da concentração para 0,5 M. A queda de rendimento foi justificada pela quebra da cadeia peptídica pela maior concentração de metabissulfito de sódio, o que permitiu que moléculas menores permeassem a membrana de diálise. Para referência foi utilizado uma manta de diálise com corte de massa molar (MWCO) entre 6 e 8 kDa, o que a princípio seria menor que a massa molar da pena de

frango que se encontra entre 10 e 20 kDa. É importante ressaltar que o rendimento máximo obtido é extremamente relevante quando comparado a outras extrações, desde que a cadeia da proteína seja preservada.

Sinkiewicz *et al.* (2017) obtiveram um rendimento semelhante de 62,9% utilizando a mesma solução de 0,5 M de agente redutor, porém em temperatura de 50 °C durante 2 horas e recuperando com uma manta menos permeável entre 3,5 e 5 kDa [32]. Em outras palavras, extraíndo a queratina em menor temperatura e tempo e recuperando de forma mais rigorosa não contribuiu para o aumento do rendimento. Desta forma, a redução de massa molar está diretamente relacionada a concentração de agente redutor, e a proteína fragmentada teria massa molar inferior a 3,5 kDa.

Diferentemente das outras reações, a hidrólise alcalina solubiliza a queratina a partir da quebra não somente das ligações dissulfeto, mas também da cadeia peptídica. Nagai e Nishikawa (1970) estudaram a hidrólise alcalina da pena de frango em 90 °C por 30 minutos utilizando uma solução diluída de hidróxido de sódio (0,1 M) [119]. Foi dissolvido cerca de 97% da massa inicial de pena, porém metade da queratina se degradou em aminoácidos livres.

Com o intuito de extrair queratina menos hidrolisada, Dąbrowska *et al.* (2021) estudaram o efeito da agitação, tempo e concentração de hidróxido de sódio na dissolução de pena de frango à temperatura ambiente [10]. Foi constatado que apenas a concentração de álcali teve uma forte influência na extração. Embora as condições tenham sido brandas, grande parte da queratina ainda foi degradada, obtendo proteína de baixa massa molar. Devido a sua massa molar menor e formação de peptídeos e aminoácidos, a queratina hidrolisada é mais indicada para a fabricação de produtos como cosméticos [120,121] e fertilizantes ricos em carbono e nitrogênio [70,122]. É importante ressaltar ainda que é necessário a neutralização da solução básica antes de seu descarte.

Os efeitos de diversos métodos químicos no rendimento e qualidade da queratina foram estudados por Shavandi *et al.* (2017) [123]. Assim como esperado, a hidrólise alcalina deteriorou a massa molar da queratina que acabou escapando da manta de diálise com MWCO entre 12 e 14 kDa, obtendo

rendimento reduzido de 25%. Por outro lado, as extrações por redução e sulfitólise produziram queratina com a cadeia peptídica essencialmente conservada em rendimentos de 53 e 41%, respectivamente. O método oxidativo resultou na extração de queratina com alta massa molar, porém com baixo rendimento de 5%, o que possivelmente inviabilizaria a escalabilidade desse método.

Métodos químicos utilizando líquidos iônicos, como o cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio ([BMIM]⁺Cl⁻) [84,124,125], e solventes eutéticos profundos (DES), como a mistura de ureia e cloreto de colina [14,66,126], também são reportados na literatura. Além desses métodos químicos, alguns autores também exploraram métodos físicos, físico-químicos e biológicos, como explosão a vapor [80], extração auxiliada por micro-ondas [26,127], degradação por micro-organismos [81,128] e hidrólise enzimática [129–131]. Independentemente do método utilizado, o rendimento da extração vai depender principalmente do pH, temperatura e tempo de reação, além do tipo e concentração de reagente [32]. Alguns métodos são mais indicados para a obtenção de queratina com cadeia preservada, como é o caso da redução ou sulfitólise branda, enquanto outros são mais indicados para a obtenção de aminoácidos e peptídeos livres, como a hidrólise alcalina e enzimática.

O método de extração de queratina é fundamental para a produção de filmes poliméricos, pois as propriedades físico-químicas da queratina extraída serão distintas [32,123]. Métodos exclusivamente redutores permitem a reoxidação dos grupos sulfidrilas em ligações cruzadas, enquanto métodos oxidativos aumentam a quantidade de grupos polares na queratina, aumentando sua hidrofiliabilidade. Muitos métodos, em especial a hidrólise alcalina, são prejudiciais a integridade da macromolécula, pois reduzem a massa molar da proteína. Tais características são essenciais quando se trata da produção de filmes de queratina pois têm influência direta nas propriedades do material, como resistência mecânica e estabilidade em contato com água.

2.7 Filmes biodegradáveis de queratina

Pesquisas têm demonstrado a viabilidade de processar queratina de penas de frango em filmes plásticos por diversos métodos. Este tópico é dedicado às publicações relacionadas aos filmes biodegradáveis produzidos a partir da queratina.

O processamento de filmes de queratina pode ser realizado tanto por casting de solução quanto por processamentos típicos de polímeros termoplásticos, porém dentro de suas limitações. Queratinas precipitadas são insolúveis e, portanto, necessitariam ser resolubilizadas para serem processadas por *casting*. Por outro lado, a solubilidade da queratina não tem tanta importância na termo-prensagem ou extrusão, além de estes processamentos permitirem a produção de filmes em maior escala e com propriedades mecânicas e resistência à água elevadas. Estas propriedades são cruciais para diversas aplicações e, de certa forma, são raras para materiais naturais de fonte renovável, como é o caso de proteínas e polissacarídeos.

Filmes de queratina possuem propriedades mecânicas comparáveis a filmes biodegradáveis produzidos com outros polímeros naturais. Alguns exemplos de propriedades mecânicas de diferentes composições de filme de queratina são mostrados na Tabela 2.2. Moore *et al.* (2006) extraíram queratina de penas de frango a partir do processo de redução com uma solução de 1,63 M de 2-mercaptoetanol, 7,87 M de ureia, 0,26 M de SDS e 0,2 M de cloridrato de tris-(hidroximetil)-aminometano (TRIS-HCl) por 1 hora em atmosfera de N₂ à 50°C e pH 9 [132]. O extrato de proteína foi dialisado por 3 dias e a concentração de proteína foi corrigida para 70 g/L. Glicerol foi adicionado na solução para se obter uma concentração de até 9% em massa de queratina, sendo então distribuído em molde por *casting* de solução e seco em temperatura ambiente. Os filmes sem glicerol obtiveram resistência à tração de $16,6 \pm 5,5$ MPa e alongamento na ruptura de $1,7 \pm 0,2\%$. O grupo observou que o aumento do teor de glicerol aumentou o alongamento na ruptura dos filmes, atingindo um máximo de $31,9 \pm 4,5\%$ para o filme com 9% de plastificante. Entretanto, essa adição de glicerol reduziu tanto a resistência à tração em 31,9% quanto o módulo de elasticidade do filme para 20 MPa.

Tabela 2.2 - Propriedades mecânicas de alguns filmes de queratina.

Processamento	Plastificante	σ (MPa)	ϵ (%)	E (MPa)	Ref.
Redução de pena de frango e <i>casting</i> de bancada	-	5,1 ± 0,2	16,3 ± 2,0	125 ± 23	[102]
	2% sorbitol	3,4 ± 0,5	52,8 ± 5,6	28 ± 8	[102]
	30% sorbitol	0,5 ± 0,0	31,7 ± 3,5	3 ± 0	[102]
Redução de pena de frango e <i>casting</i> de bancada	-	16,6 ± 5,5	1,7 ± 0,2	10,2 ± 7,1	[132]
	3% glicerol	7,6 ± 0,6	13,8 ± 2,4	2,1 ± 0,6	[132]
	9% glicerol	2,0 ± 0,2	31,9 ± 4,5	0,2 ± 0,0	[132]
Redução de pena de frango e termo-prensagem	20% glicerol	10,5 ± 1,3	40,5 ± 3,0	-	[62]
	35% glicerol	7,8 ± 1,7	63,8 ± 4,5	-	[62]
	40% glicerol	5,7 ± 0,5	43,6 ± 2,0	-	[62]
Redução de lã de ovelha e fiação úmida	-	101 ± 15	10,9 ± 2,9	-	[133]

Martelli *et al.* (2006) [102] extraíram queratina de penas de frango pelo mesmo procedimento anterior, porém foram produzidos filmes de queratina com a adição de até 30% em massa de sorbitol [132]. Os filmes puros obtiveram 5,1 MPa de resistência à tração, 16,3 % de alongamento na ruptura e 125 MPa de módulo de elasticidade. A adição de sorbitol em baixa concentração, 2% em massa de queratina, mais que triplicou o valor de alongamento na ruptura, indicando que o sorbitol também é um bom plastificante para a queratina. Entretanto, o aumento da concentração de sorbitol acima de 2% diminuiu progressivamente todas as propriedades mecânicas dos filmes, sugerindo uma saturação de plastificante no sistema.

Embora o *casting* de solução seja o método mais empregado para se produzir filmes de queratina, a evaporação do solvente é lenta e o método necessita que a proteína seja completamente solúvel, limitando o seu uso para certas metodologias de extração e recuperação. Alternativamente, alguns pesquisadores processaram a queratina por termo-prensagem. Esse é um

processamento tradicional aplicado em polímeros, tanto para termoplásticos quanto para elastômeros. A termo-prensagem consiste na aplicação de temperatura e pressão sobre um material termoplástico carregado em um molde. A temperatura e a pressão permitem a plastificação, escoamento e conformação do material em diversas geometrias [134].

Uma das vantagens de se utilizar a termo-prensagem é a capacidade de processar materiais de alta viscosidade, ou ainda permitir que reações, como a formação de ligações cruzadas, ocorram em altas temperaturas sem comprometer a conformação. Outra peculiaridade desse processamento é não exigir altos custos de equipamentos e ferramentas em comparação com outros métodos, como a extrusão e injeção. Embora tenha maior produtividade que o *casting* convencional, a termo-prensagem ainda é um processo mais lento em comparação com os métodos de extrusão e injeção e pode não ser tão preciso para peças com detalhes mais complexos [135].

Barone *et al.* (2005) fizeram a prensagem a quente de penas de frango *in natura* com e sem glicerol [35]. Os filmes foram formados com compressão entre 7 e 16 MPa a 160 °C variando o tempo entre 2 e 8 minutos. Os pesquisadores concluíram que filmes puros de pena de frango se demonstraram frágeis mecanicamente. De forma semelhante, a composição de 15% mostrou vestígios de pena, resultando em defeitos visuais no filme. Filmes com concentração de glicerol igual ou superior a 50% não ficaram coesos, apresentando buracos. Além disso, o glicerol exsudou após 12 horas quando adicionado em teores iguais ou maiores que 30%. Este estudo demonstrou que, embora os filmes possuam defeitos e problemas de compatibilidade, é possível processar termicamente a pena de frango sem necessariamente extrair a queratina.

Katoh *et al.* (2004) estudou a moldagem por compressão de queratina de lã de ovelha extraída por sulfitólise. A proteína foi obtida com uma solução de metabissulfito de sódio (0,526 M), ureia (8 M), e SDS (0,173 M) a 100 °C por 30 minutos. A queratina foi misturada com uma solução de álcool 90% em razão mássica de 1:1 e, então, prensada em filmes transparentes por 5 min a 5 MPa seguido de 5 min a 10 MPa. Temperaturas de processamento inferiores a 80 °C produziram filmes pouco manuseáveis, julgando pela sua menor resistência

mecânica. O aumento da temperatura do molde até 120 °C aumentou a resistência mecânica do filme em umidade relativa de 65%, atingindo valores máximos de 27,8 MPa e 1,2 GPa de resistência a tração e módulo elástico, respectivamente. Como nenhum plastificante foi adicionado à mistura, todas as composições se demonstraram extremamente frágeis, com alongamento na ruptura menor que 5%. A partir de 120 °C, os filmes de queratina sofreram degradação térmica, apresentando uma cor amarelada forte e vazios que afetaram negativamente as propriedades mecânicas e qualidade visual.

Dou e colaboradores (2015) também processaram queratina por termo-prensagem, sendo a proteína extraída por redução com sulfeto de sódio (0,34 M), ureia (7 M) e SDS (0,0023 M) [62]. Filmes com concentrações de 20 a 40% de glicerol por massa de queratina foram prensados com pressão de 10 MPa por 6 min a 130 °C. O filme com concentração de 20% de glicerol teve a maior resistência à tração de 10,5 MPa caindo para 5,7 MPa com o aumento de glicerol para 40%. Os pesquisadores também observaram o fenômeno de exsudação de glicerol na superfície do filme para concentrações de 40%.

As propriedades mecânicas de filmes de queratina extraída de lã de ovelha com líquido iônico ([BMIM]⁺Cl⁻) também foram avaliadas [36]. Os filmes foram plastificados com 50% de glicerol em massa de proteína e processados a 120 °C com pressão de 10 MPa por 5 min. Foi identificado uma queda de massa molar para altas temperaturas de extração (180 °C), gerando um material com distribuição de massa molar (MWD) maior e perda de resíduos de cisteína. Consequentemente, o filme dessa queratina apresentou baixa resistência à tração e maior alongamento na ruptura. Além disso, imagens de microscopia eletrônica comprovaram que as amostras tiveram microestrutura bifásica, uma rica em queratina e a outra em glicerol.

Outros pesquisadores também avaliaram o comportamento da resistência mecânica de filmes de queratina com adição de ácido cítrico. Ramirez e colaboradores (2017) [136] desenvolveram filmes de queratina plastificados com 40% em massa de ácido cítrico por *casting* de solução convencional. A queratina foi extraída de lã de ovelha por sulfitólise utilizando solução de metabissulfito de sódio (0,5 M) e ureia (8 M) a 65 °C por 2 horas, sendo recuperada por diálise por

3 dias seguido de liofilização. Estes filmes demonstraram elevadíssimo alongamento na ruptura, 646%, porém com baixíssima resistência à tração, 0,28 MPa. O alto grau de alongamento foi associado a maior quantidade de queratina com estrutura de hélice- α , comum em lã, mas que normalmente é perdida após a extração. Entretanto, tratamentos térmicos entre 80 e 120 °C aumentaram a resistência à tração dos filmes em até 5 vezes, reduzindo o alongamento na mesma proporção. Este efeito foi explicado pela reticulação da queratina com o ácido cítrico em temperatura elevada. Os filmes eram insolúveis em água, porém uma perda de massa foi observada após 2 h de imersão em água, sendo atribuída majoritariamente ao ácido cítrico livre no filme.

A revisão da literatura apresentada denota um interesse evidente no desenvolvimento de novos materiais à base de queratina, visto a difusão de estudos que aplicam esta proteína em diversas áreas. Contudo, são necessárias mais investigações sobre métodos de extração de queratina que sejam eficientes e com mínima degradação da proteína. É notado ainda uma dependência da diálise na purificação de queratina, uma metodologia com limitação de produtividade que envolve membranas de alto custo. Adicionalmente, a literatura ainda não apresentou estudos sobre a avaliação dos efeitos da precipitação nas diferentes características da queratina, como massa molar, polidispersividade, morfologia, cristalinidade e hidrofobicidade. Estas questões são cruciais para o desenvolvimento de novos materiais a base de queratina com propriedades apropriadas para as mais diversas aplicações.

É esperado que esta tese de doutorado preencha a lacuna de conhecimento sobre a precipitação da queratina por diferentes métodos, especialmente quando realizada diretamente em solução concentrada de ureia. O estudo almeja contribuir para o desenvolvimento de métodos mais eficientes de recuperação e processamento dessa proteína versátil e promissora. A motivação dessa tese foi valorizar um resíduo altamente abundante da agroindústria do Brasil – as penas de frango. Foram explorados novos métodos de precipitação de queratina, visando produzir plásticos biodegradáveis a partir de uma metodologia rápida, acessível e de impacto ambiental reduzido. Esta tese de doutorado se insere na pesquisa e desenvolvimento tecnológico de

materiais sustentáveis, uma vez que se preza pelo reaproveitamento e valorização de resíduos industriais por meio de técnicas inovadoras dentro da área de estudo. Nas próximas seções, serão detalhados os objetivos e as estratégias adotadas para a extração, precipitação e processamento da queratina, assim como as análises químicas, estruturais e morfológicas, bem como os ensaios das propriedades dos filmes plásticos produzidos.

3 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi extrair queratina da pena de frango por meio da sulfitólise e aplicar diversos métodos de precipitação de proteína, produzir filmes termoplásticos de queratina por termo-prensagem e avaliar o efeito dos precipitantes nas propriedades dos filmes. Foram traçados os seguintes objetivos específicos:

- ❖ Avaliar o efeito do agente de precipitação na recuperação de queratina diretamente da solução de sulfitólise;
- ❖ Caracterizar as queratinas obtidas por precipitação quanto a composição, massa molar e estrutura cristalina;
- ❖ Identificar os gargalos ambientais do ciclo de vida da produção de queratina por sulfitólise e precipitação;
- ❖ Estudar a redução dos impactos ambientais do ciclo de vida a partir da reciclagem de acetona;
- ❖ Preparar filmes de queratina por termo-prensagem e caracterizar sua morfologia e estrutura cristalina;
- ❖ Avaliar os impactos dos métodos de precipitação nas propriedades mecânicas e óticas dos filmes de queratina, assim como sua estabilidade em água.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

O resíduo de penas de frango brancas (*Gallus gallus domesticus*) foi fornecido por um abatedouro local (Pirangi, SP, Brasil). O ácido cítrico anidro ($C_6H_8O_7$) foi adquirido da ACS Científica, enquanto acetona (C_3H_6O), etanol (C_2H_5OH), glicerol ($C_3H_8O_3$), ácido clorídrico (HCl), cloreto de sódio (NaCl), hipoclorito de sódio (NaClO), metabissulfito de sódio ($Na_2S_2O_5$) e ureia (CH_4N_2O) foram adquiridos da Synth. Todos os reagentes eram de grau analítico e utilizados conforme recebidos. Água ultrapura ($\rho = 18,2 \text{ M}\Omega/\text{cm}$) foi obtida utilizando um sistema de purificação Barnstead Nanopure Diamond (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA).

4.2 Pré-tratamento do resíduo de pena de frango

A limpeza e esterilização dos resíduos de penas de frango foram realizadas a partir de métodos previamente reportados na literatura com algumas modificações [8,73,137]. Inicialmente, as penas foram submetidas a um processo de lavagem utilizando água para remover qualquer matéria solúvel e detritos. Em seguida, os resíduos de penas foram imersos em uma solução de NaClO com concentração de 0,1% (m/m) por 30 minutos, com o objetivo de eliminar patógenos. Para garantir uma sanitização completa e remover qualquer gordura, as penas foram imersas em etanol puro por 30 min após passarem por mais uma rodada de lavagem para remover o NaClO. Por fim, as penas de frango limpas (CCF) foram secadas a uma temperatura de 60 °C e então moídas usando um moinho *Wiley* (Solab Científica Ltda., Brasil).

4.3 Extração de queratina por sulfitólise

A extração de queratina foi realizada por meio da sulfitólise com base nas condições descritas na literatura [26,30]; no entanto, as condições foram ajustadas para obter o rendimento mais alto possível sem causar danos à estrutura primária da proteína. O metabissulfito de sódio foi utilizado por ser um agente redutor de baixo custo e menos prejudicial ao meio ambiente e saúde

humana do que outros agentes redutores, como o 2-mercaptoetanol [31,32]. O uso de surfactante foi evitado, pois seu emprego permitiria a formação de complexos proteína-surfactante que dificultaria a precipitação da queratina [100,133,138].

50 gramas de CCF foram imersas em 1 L de uma solução aquosa contendo 8 M de ureia e 0,2 M de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ a 65 °C e pH 6,5 por 2 horas. A mistura foi filtrada usando uma malha de aço inoxidável e centrifugada a 10000 RCF por 10 minutos para eliminar qualquer resíduo de pena não dissolvido. O sobrenadante foi coletado e utilizado para precipitar a queratina.

4.4 Precipitação de queratina

A precipitação da queratina foi realizada diluindo o sobrenadante e utilizando diferentes agentes precipitantes: ácido clorídrico (KHA), ácido cítrico (KCA), cloreto de sódio (KSC) e acetona (KAT). As precipitações isoelétricas foram realizadas ajustando o pH da solução para o ponto isoelétrico (pH 3,5 - 4,0) utilizando HCl ou ácido cítrico. O *salting out* foi feito a partir da adição de NaCl até uma concentração de 5% (m/v) (~0,86 M). Tanto a precipitação isoelétrica quanto o *salting out* foram realizados após uma diluição de 3 vezes com água ultrapura. A precipitação com solvente orgânico foi realizada adicionando acetona até uma concentração final de acetona de 75% (v/v), o que equivale a uma diluição da solução de sulfitolise com 3 volumes de solvente. As soluções foram, então, deixadas em repouso por 30 minutos, centrifugadas a 10000 RCF por 10 minutos, lavadas duas vezes com água ultrapura utilizando o mesmo ciclo de centrifugação e liofilizadas até completa secagem. As queratinas precipitadas foram guardadas em dessecador contendo sílica gel até o momento de seu processamento.

A decisão de utilizar cloreto de sódio no *salting out* da queratina foi baseada na facilidade de escalonamento desse sal. O cloreto de sódio é um sal de baixo custo, inodoro, baixa reatividade com proteínas e alta estabilidade em solução [59]. O sulfato de amônio, embora muito utilizado para se precipitar proteínas, é um sal relativamente mais caro e mais reativo que o NaCl. A concentração de sal utilizada foi baseada em testes preliminares e limitada pela

elevada razão entre NaCl/pena de frango, pois valores superiores implicariam em uma quantidade muito grande de sal incorporado na queratina. Uma solução salina de 5% de NaCl já representa uma massa 4 vezes superior a massa de pena sendo extraída.

4.5 Produção de filmes de queratina por termo-prensagem

Primeiramente, glicerol foi solubilizado em água na proporção mássica de 1:5 e a mistura foi homogeneizada. Essa solução de glicerol foi adicionada à queratina liofilizada na proporção mássica de 3:2, o que representa um teor de 25% de glicerol com base na massa de queratina, ou 20% com base na massa total de filme seco. A mistura foi deixada em repouso por 1 hora e, em seguida, foi colocada em um molde quadrado 10x10 cm com 0,2 mm de profundidade. As amostras foram inicialmente aquecidas por 5 min a 120 °C e depois prensadas sob 5 MPa por 1 min e 10 MPa por 4 min na mesma temperatura usando uma prensa com aquecimento SL-11/15 (Solab Científica Ltda., Brasil). A temperatura e tempo de prensagem foram baseados nos resultados de Katoh *et al.* 2004 [139]. Após a termo-prensagem, os moldes contendo os filmes foram colocados entre placas de alumínio para resfriar. Quando atingiram a temperatura ambiente, os filmes foram desmoldados e armazenados em um dessecador contendo sílica gel por pelo menos 48 horas para remover qualquer quantidade de umidade residual. Após esse período, os filmes foram cortados em corpos-de-prova que foram condicionados em ambiente controlado de acordo com as caracterizações posteriores.

4.6 Rendimento da extração de queratina

O rendimento da extração (Y) para cada método de precipitação foi calculado pela Equação 4.1, onde m é a massa de queratina após a liofilização e m_0 é a massa inicial de CCF, corrigida pelo teor de queratina nas penas de frango, 91% em massa de acordo com Pedram Rad *et al.* (2012) [138].

$$Y\% = 100 \frac{m}{(0,91 m_0)} \quad (4.1)$$

4.7 Análise elementar

A análise elementar foi realizada em duplicata utilizando um analisador elementar CHN da série II PerkinElmer 2400 (*PerkinElmer Inc.*, EUA). O teor de proteína bruta foi estimado multiplicando o teor de nitrogênio por um fator de conversão. Para penas de frango, o fator de conversão é aproximadamente 6,66, o que corresponde a um teor de nitrogênio de 15% [78].

4.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A massa molar e distribuição de massa molar foram avaliadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com dodecilsulfato de sódio (SDS) seguindo a metodologia de Laemmli (1970) [140]. Cerca de 160 mg de cada amostra de queratina foram solubilizadas em 1 mL de solução tampão Laemmli por 10 minutos à 100 °C. O material insolúvel foi separado por centrifugação (10000 RFC por 30 min) e 20 µL do sobrenadante contendo a proteína foram então carregados em poços de um gel de poliacrilamida previamente preparado com 14% de acrilamida. 10 µL do padrão *BlueEye Prestained Protein Marker* (Cellco Biotec Ltda., Brasil) foi adicionado como marcador para a faixa de massa molar de 11 a 245 kDa. O gel foi colocado em uma cuba de eletroforese e submerso em solução tampão TRIS-glicina-SDS. A eletroforese foi realizada com fonte de 5 W em voltagem constante de 150 V por cerca de 60 min e, após a separação da proteína, o gel foi corado com corante Azul de Coomassie, descorado e digitalizado.

A digitalização do gel foi analisada com o *software* ImageJ versão 1.52a. A imagem foi convertida em preto e branco (32 *bit*) e calibrada pela migração (distância percorrida) relativa das bandas do padrão. A relação migração relativa à altura do gel e massa molar do padrão foi modelada por duas regressões lineares: uma para migrações relativas inferiores a 5% e outra para distâncias superiores a 5%. A curva de calibração e as equações utilizadas se encontram no Apêndice B.

A distribuição de massa molar (MWD) foi estimada pelo método de área descrito por Bickle e Traut (1974) [141]. Primeiramente, a intensidade de cor em função da migração relativa foi obtida pelo *software* e a área abaixo da curva de intensidade foi mensurada para as regiões com bandas visíveis. A intensidade de cor da banda é proporcional a concentração de proteína na região e, portanto, a massa de proteína pertencente àquela banda pode ser estimada. A massa de proteína pertencente a uma banda foi estimada pela razão entre a área da banda (A_i) em relação a somatória de todas as áreas. A massa molar ponderal média (M_w) foi calculada pela Equação 4.2, enquanto a massa molar numérica média (M_n) foi mensurada pela Equação 4.3 [141]. O índice de polidispersividade (IP) foi calculado pela razão M_w/M_n .

$$M_w = \frac{\sum A_i M M_i}{\sum A_i} \quad (4.2)$$

$$M_n = \frac{\sum A_i}{\sum (A_i / M M_i)} \quad (4.3)$$

4.9 Difractometria de raios-X

A difratometria de raios-X (DRX) foi realizada em um difratômetro de pó Bruker D8 *Advance* ECO (Bruker Corp., EUA) utilizando a geometria Bragg–Brentano. As amostras foram varridas de 5° a 60° (2θ) utilizando radiação Cu K α ($\lambda = 0,154$ nm) por 60 minutos, e o índice de cristalinidade (X_c) foi calculado utilizando abordagens de deconvolução de picos [142,143]. Os espectros de difração foram simulados com curvas gaussianas localizadas aproximadamente em ângulos de difração de 9°, 20°, 25°, 30° e 40°. A gaussiana localizada em 25° foi a única curva com posição fixa e ela representa a continuação do halo amorfo, como indicado por Haibo Xie et al. (2005) [124]. As curvas em aproximadamente 9° e 20° foram representativas das estruturas secundárias da queratina. O índice de cristalinidade foi estimado pela razão entre a soma das áreas dos picos cristalinos em função da área de todas as curvas.

Amostras de filme foram preparadas congelando em nitrogênio líquido e moendo manualmente com um pilão e almofariz. As penas de frango, por outro lado, foram moídas em um pó fino utilizando um moinho de rotor de velocidade variável Pulverisette 14 *classic line* (*Fritsch Milling & Sizing, Inc.*, EUA), operando a 6000 rpm também com auxílio de nitrogênio líquido.

4.10 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) operando no modo de reflexão total atenuada (ATR) foi realizada em um espectrômetro FT-NIR VERTEX (*Bruker Corp.*, EUA). Os espectros de FTIR-ATR foram registrados na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} com uma resolução de 2 cm^{-1} e 32 acumulações espectrais. A fração das estruturas secundárias das proteínas foi obtida por meio do método de deconvolução da banda Amida I [127,144,145]. Para isso, foi traçado uma linha de base entre 1720 e 1578 cm^{-1} e o sinal foi simulado com curvas gaussianas fixadas em posições com base nos valores mínimos da derivada segunda do sinal. A identificação de cada curva gaussiana foi feita em relação a sua posição central seguindo a Tabela 4.1. O índice de cristalinidade foi determinado pela somatória das áreas das gaussianas referentes as estruturas secundárias hélice- α e folha- β em função da área total do sinal. A preparação das amostras seguiu o mesmo procedimento que a difração de raios-X.

Tabela 4.1 - Atribuição das posições da banda amida I à estrutura secundária das proteínas [146].

Estrutura secundária	Número de onda (cm^{-1})	
	Média	Intervalo
Hélice- α	1654	1657-1648
Folha- β	1633	1641-1623
	1684	1695-1674
Desorganizada	1654	1657-1642
Dobras	1672	1686-1662

4.11 Análise termogravimétrica

As curvas termogravimétricas foram registradas em um analisador termogravimétrico TGA Q500 (*TA Instruments Inc.*, EUA), utilizando amostras de pena de frango e queratina precipitada de aproximadamente 6 mg em recipiente de platina. A análise se deu até 700 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min sob atmosfera de ar sintético (80% N₂ e 20% O₂) fluindo a 60 mL/min.

4.12 Microscopia eletrônica de varredura

Fraturas transversais dos filmes de queratina foram feitas por imersão em nitrogênio líquido. As superfícies externa e de fratura criogênica foram revestidas com platina e analisadas em um microscópio eletrônico de varredura JSM-6510 (*JEOL, Ltd.*, Japão) no modo de elétrons secundários, com uma voltagem de aceleração de 2 kV.

4.13 Ensaio de Tração

Amostras de cada filme de queratina foram cortadas em corpos-de-prova retangulares de 60x10 mm e condicionadas em dessecador contendo uma solução saturada de nitrato de magnésio a 25 °C (UR = 54%) por pelo menos 48 horas. Os testes mecânicos foram realizados em um texturômetro TA.XTplus (*Stable Micro Systems*, Reino Unido) usando uma célula de carga de 50 kgf, distância de garra de 40 mm e velocidade de deslocamento de 10 mm/min. A espessura das amostras foi medida com um micrômetro (*Mitutoyo Corp.*, Japão). A resistência à tração (σ) foi calculada dividindo a carga na fratura pela área da seção transversal da amostra. O módulo de elasticidade (E) foi determinado por regressão linear na região linear da curva tensão-deformação, entre 0,5 e 2,0% de deformação. O alongamento na ruptura (ϵ) foi calculada com base na variação percentual no comprimento original da amostra entre as garras. Foram feitas cinco medições independentes seguindo a norma ASTM D882-10 (2010) [147].

4.14 Colorimetria

Os parâmetros de cor no sistema CIELab e a transparência dos filmes de queratina foram determinados usando um colorímetro digital CR 400 (Konica Minolta, Inc., Japão). O equipamento foi calibrado com um padrão branco e foram realizadas cinco medições usando uma fonte de luz de xenônio. No sistema de cor CIELab, L^* indica a luminosidade ($L^* = 0$, preto; $L^* = 100$, branco), enquanto as coordenadas cromáticas a^* e b^* fornecem informações sobre os tons de cor: verde/vermelho ($a^* < 0$, verde; $a^* > 0$, vermelho) e azul/amarelo ($b^* < 0$, azul; $b^* > 0$, amarelo), respectivamente. A transparência do filme (T) foi estimada pela razão da luminosidade em relação a um padrão preto (X_{preto}) e um padrão branco (X_{branco}), conforme indicado na Equação 4.4.

$$T(\%) = 100 \left(1 - \frac{X_{preto}}{X_{branco}} \right) \quad (4.4)$$

4.15 Espectroscopia na região do ultravioleta-visível

A técnica de espectroscopia de absorção nas regiões ultravioleta e visível (UV-Vis) foi empregada para se avaliar a transparência dos filmes para diversos comprimentos de onda. Os espectros foram obtidos entre 250 e 800 nm em um espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu 1600 (*Shimadzu Corp.*, Japão).

4.16 Determinação da solubilidade e capacidade de absorção de água

Os filmes de queratina foram cortados em tiras com área de 2 cm², pré-condicionados em um dessecador contendo sílica gel por 24 horas e, em seguida, secados em estufa de circulação de ar a 80 °C por 2 horas. As amostras foram pesadas imediatamente após a secagem (m_0) e imersas em 30 mL de água ultrapura a 25 °C por 24 horas. Após a imersão, a água superficial foi removida com papel de filtro por 1 minuto e as amostras inchadas foram pesadas (m_i). Por fim, os filmes úmidos foram secos a 80 °C até massa constante e a massa seca foi medida (m_s). A solubilidade em água (S_w) foi calculada pela perda de massa em relação à massa inicial, como mostrado na Equação 4.5.

$$S_w(\%) = 100 \left(\frac{m_0 - m_s}{m_0} \right) \quad (4.5)$$

A capacidade de absorção de água (U_w) foi determinada pela massa ganha após a imersão em relação à massa inicial, como indicado na Equação 4.6. As medições foram realizadas em triplicata e qualquer manipulação foi feita com pinças. O condicionamento inicial foi aplicado para reduzir a exposição dos filmes a altas temperaturas durante a primeira secagem. Após a imersão de 24 horas, o pH da solução foi testado.

$$U_w(\%) = 100 \left(\frac{m_i - m_0}{m_0} \right) \quad (4.6)$$

4.17 Ângulo de contato

As medições do ângulo de contato foram realizadas de forma dinâmica com um medidor KSV CAM-101, equipado com uma câmera digital CCD KSV-5000 e processado pelo software KSV CAM2008 (*KSV Instruments Ltd.*, Finlândia). Foram realizadas cinco medições independentes, com a aplicação de 5 μ L de água ultrapura em cada filme, registrando sua forma a cada segundo durante 2 minutos. O primeiro segundo foi registrado a cada 100 ms para melhor precisão da evolução do ângulo de contato com o tempo.

4.18 Avaliação de ciclo de vida

A avaliação de ciclo de vida (ACV) é uma ferramenta amplamente empregada na avaliação dos impactos ambientais de cadeias de processos e produtos [148]. No contexto desta tese, a ACV foi aplicada em função de três objetivos: (i) estimar as pegadas ambientais dos diferentes métodos de precipitação da queratina; (ii) identificar os principais gargalos ambientais do ciclo de vida da queratina; e (iii) avaliar a sensibilidade dos indicadores ambientais da KAT em função da reciclagem de acetona. A ACV foi realizada de acordo com a norma ISO 14044 [148] com limite de estudo do berço ao portão

(*cradle-to-gate*). A unidade funcional adotada na análise foi fixada em 1 tonelada de queratina produzida, o que representa o processamento do resíduo de pena de frango gerado de aproximadamente 7 a 20 mil animais, dependendo do rendimento da extração de queratina. Esta produção de frangos equivale a aproximadamente a produção diária de um abatedouro de pequeno porte.

O sistema de produto (ciclo de vida modelado) da ACV está esquematizado na Figura 4.1 e uma descrição detalhada do inventário do ciclo de vida (ICV) com os fluxos de entrada e saída de cada processo é fornecida no Apêndice C. O contorno do sistema incluiu diversos processos, sendo alguns agrupados em blocos que representam etapas específicas do processamento. As etapas e seus respectivos processos (em parênteses) foram: produção das aves (pecuária, escaldagem e depenagem), pré-tratamento do resíduo (limpeza, secagem e moagem), extração (sulfitolise), recuperação (precipitação) e purificação (purificação e liofilização) da queratina.

A influência da reciclagem da acetona nos indicadores ambientais foi examinada por meio de uma análise de sensibilidade, utilizando taxas de reutilização entre 25% e 90%. As simulações foram conduzidas avaliando somente a realimentação do processo de precipitação com acetona reciclada. Portanto, a demanda por acetona primária no ICV foi reduzida e o consumo energético ligado à recuperação do solvente foi desconsiderado.

A gestão dos resíduos não foi contemplada na ACV. Os requisitos de energia foram estimados a partir de dados de laboratório ou do cálculo de potência do equipamento e tempo de uso recomendados pelos fabricantes. A produtividade das etapas de escaldagem e depenagem foram baseados em especificações de equipamentos industriais. A extração de queratina foi baseada nos métodos citados nessa tese em escala laboratorial. As entradas de energia e material aplicadas na ACV foram selecionadas do banco de dados da Ecoinvent v3.7 (*Ecoinvent Association*, Suíça).

A avaliação dos impactos do ciclo de vida (AICV) foi implementada usando o software OpenLCA (*GreenDelta GmbH*, Alemanha) seguindo a abordagem ReCiPe 2016 *Midpoint* (H). As categorias de impacto ambiental calculadas estão

listadas na Tabela 4.2, assim como suas siglas e unidades. Descrições mais detalhadas das unidades empregadas se encontram no Apêndice A.

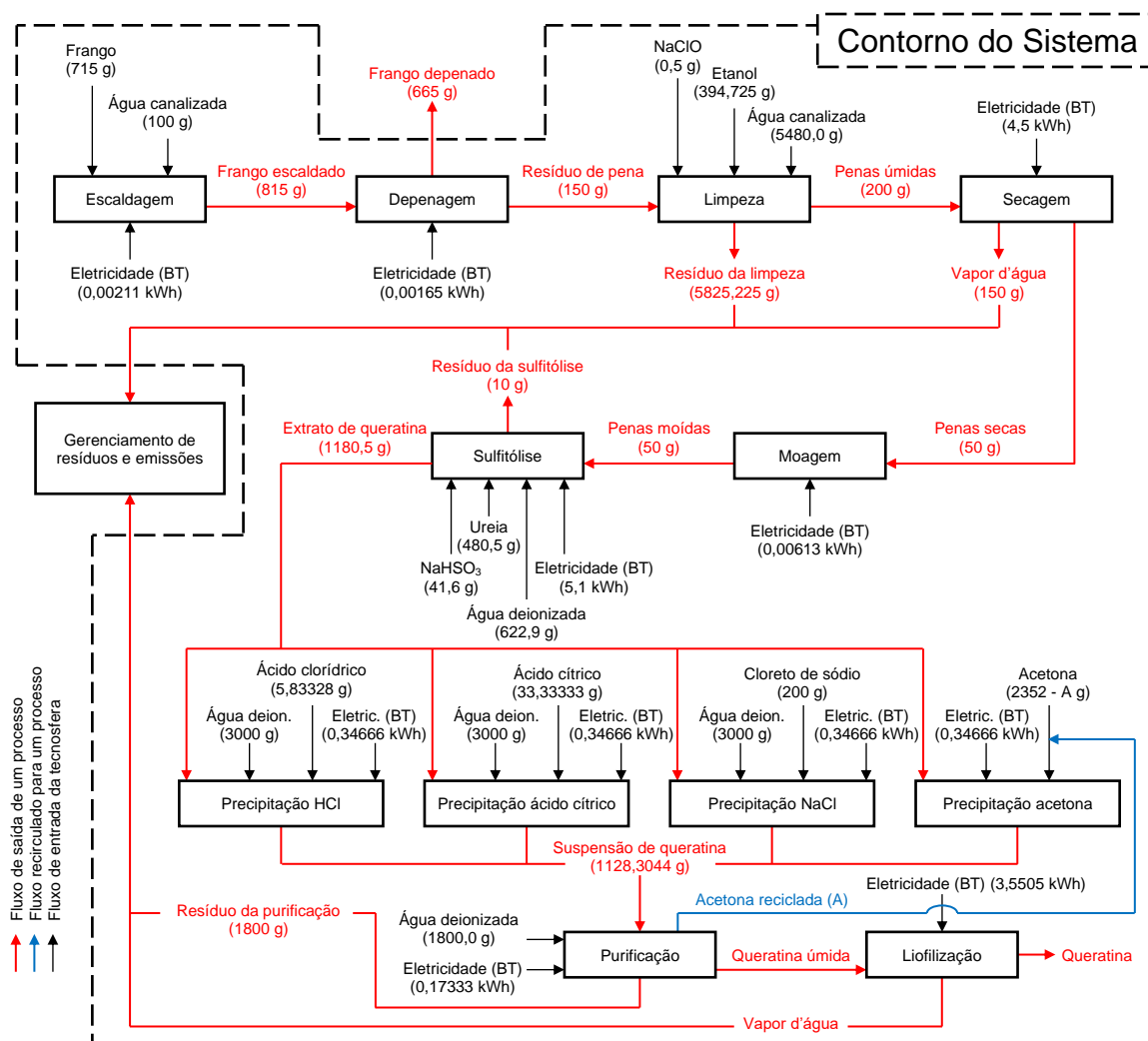


Figura 4.1 - Diagrama dos processos e contorno do sistema da produção de queratina de pena de frango. O inventário de ciclo de vida se encontra completo no Apêndice C. A = massa de acetona reciclada; BT = baixa tensão; Deion. = deionizada; e Eletric. = eletricidade.

A avaliação de ciclo de vida teve como foco maior as categorias de aquecimento global (GLWM), consumo de água (WTRC), toxicidade humana não carcinogênica (HNTX), ecotoxicidade de água doce (FWTX), escassez de recursos fósseis (FSRS) e uso da terra (LAND). Essas categorias foram selecionadas por representarem uma visão ampla dos impactos ambientais

frente as emissões, uso de recursos e saúde humana. Os processos da produção de queratina foram agrupados nos conjuntos: produção das aves (pecuária, escaldagem e depenagem), pré-tratamento (limpeza, secagem e moagem), sulfitólise (obtenção da solução de queratina), precipitação (adição dos agentes precipitantes) e purificação (lavagem por centrifugação e liofilização).

Tabela 4.2 - Categorias de impacto ambiental estudadas na análise de ciclo de vida da produção de queratina.

Categoria de impacto ambiental (<i>midpoints</i>)	Sigla	Unidade
Aquecimento global	GLWM	ton CO ₂ eq.
Consumo de água	WTRC	10 ³ m ³
Toxicidade humana não carcinogênica	HNTX	ton 1,4-DCB
Ecotoxicidade de água doce	FWTX	ton 1,4-DCB
Escassez de recursos fósseis	FSRS	ton oil eq.
Uso de terra	LAND	10 ³ m ² a crop eq.

4.19 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Os valores médios foram comparados usando o teste de Tukey a um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). As médias que forem acompanhadas da mesma letra são significativamente diferentes dentro do nível de confiança.

4.20 Diagrama da metodologia

Para simplificar o entendimento da metodologia aplicada, um diagrama esquemático está ilustrado na Figura 4.2. Está ilustrado todos os processos produtivos realizados em laboratório, assim como os materiais produzidos e as análises realizadas.

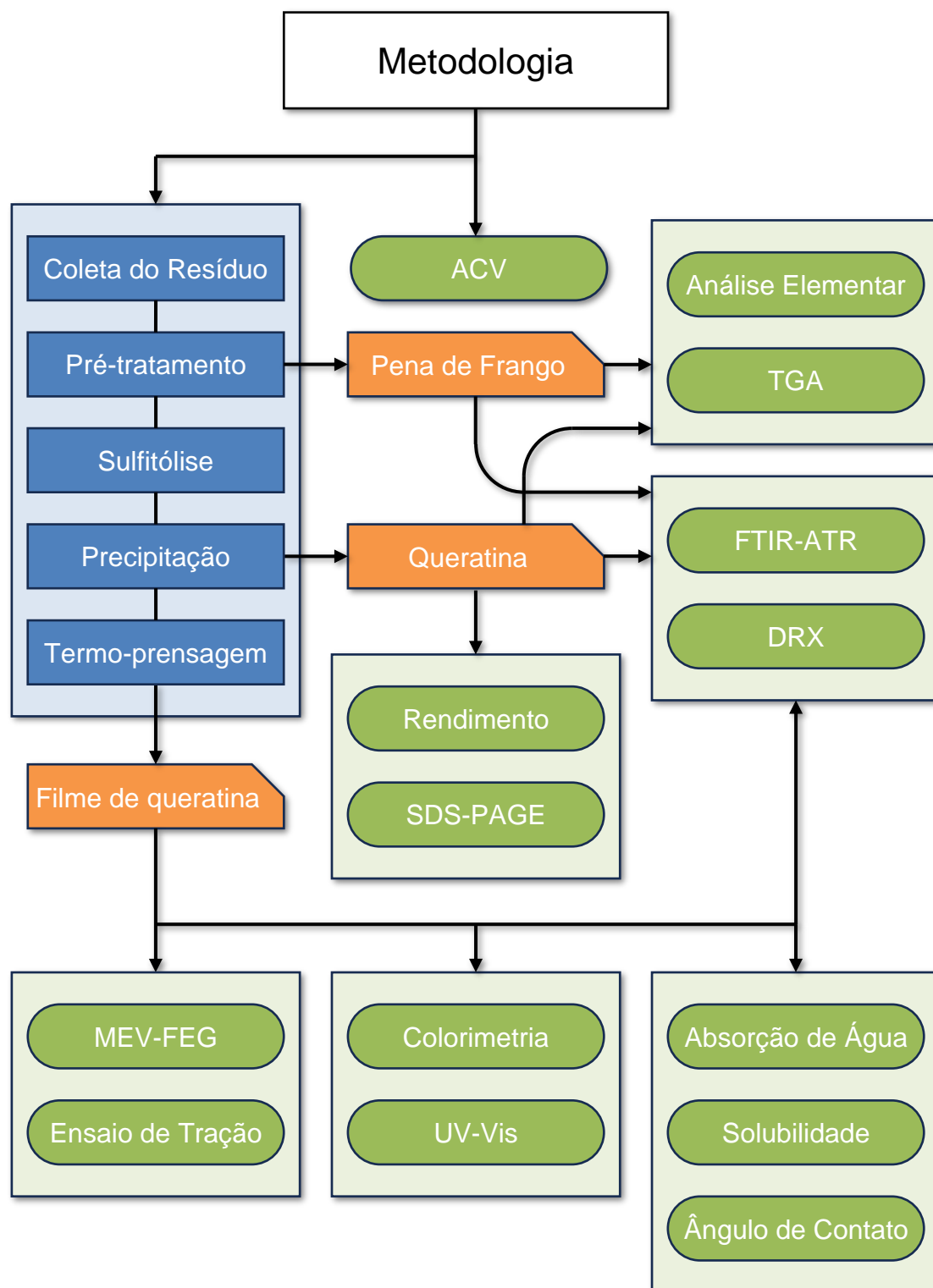


Figura 4.2 - Diagrama esquemático da metodologia da tese de doutorado. Azul representa os processos produtivos, laranja indica os materiais produzidos, e verde são as análises realizadas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração e precipitação de queratina

A extração da queratina das penas de frango limpas (CCF) foi feita a partir de uma solução de ureia e metabissulfito de sódio que corresponde ao método de sulfitolise, Figura 2.19. Nesta solução, íons sulfito (SO_3^{2-}) e bissulfito (HSO_3^-) quebram as ligações dissulfeto ($-\text{S}-\text{S}-$) da queratina [149,150] com o auxílio da ureia, que permitiu o inchamento da estrutura fibrilar compacta da pena de frango, Figura 2.16 [17,26,27]. Para se recuperar a queratina evitando as desvantagens da diálise, a precipitação da proteína foi realizada usando diferentes agentes precipitantes e o rendimento de cada método pode ser visto na Figura 5.1.

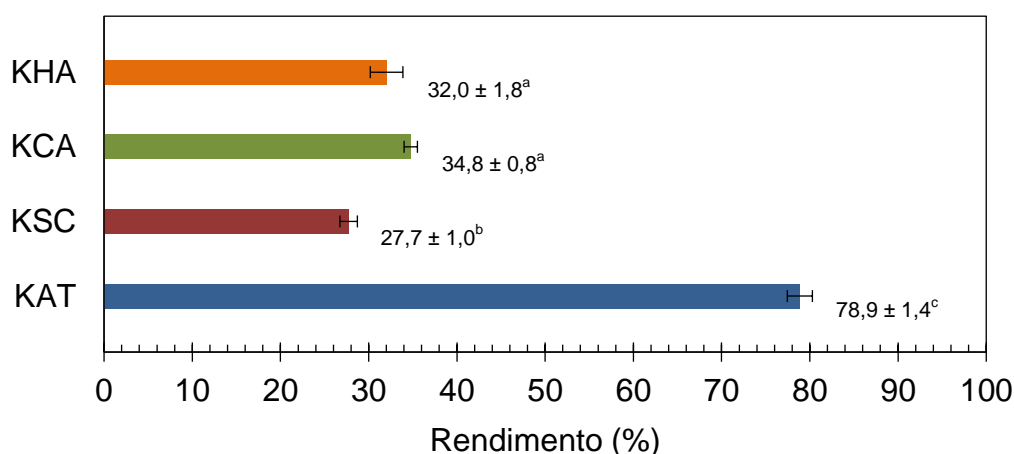


Figura 5.1 - Rendimento de precipitação de queratina por ácido clorídrico (KHA, laranja), ácido cítrico (KCA, verde), cloreto de sódio (KSC, vermelho) e acetona (KAT, azul). Médias acompanhadas pela mesma letra não diferem significativamente pelo método de Tukey ($p > 0,05$).

A precipitação com acetona (KAT) teve o maior rendimento, recuperando cerca de 79% de queratina em relação a massa de proteína presente nas penas de frango, demonstrando a sua eficiência na precipitação da queratina. A precipitação por *salting out* (KSC) teve o pior desempenho dentre os métodos avaliados, enquanto as precipitações isoelétricas com HCl e ácido cítrico (KHA

e KCA, respectivamente) não tiveram rendimentos significativamente diferentes entre si.

A eficiência de precipitação com acetona está associada a capacidade de formar uma mistura homogênea com a solução de sulfitólise ao mesmo tempo em que a constante dielétrica da mistura é reduzida. Uma solução contendo 8 M de ureia possui constante dielétrica de aproximadamente 95 [151], enquanto a acetona pura apresenta uma constante dielétrica de 19,6 [60]. A diminuição da constante dielétrica da solução de sulfitólise com a adição de acetona provoca mudanças conformacionais na queratina, expondo os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos para o meio e aumentando a interação entre os resíduos carregados, com conseqüente precipitação da proteína. Além disso, o efeito de precipitação com solvente orgânico também é auxiliado pela presença de íons na solução. A dissociação de metabissulfito de sódio libera cátions Na^+ e ânions SO_3^{2-} e HSO_3^- , proporcionais ao pH, aumentando a força iônica do sistema. O aumento da força iônica aumenta a solvatação desses íons por moléculas de água, as quais saem da camada de solvatação ao redor da proteína, expondo-a. A menor camada de solvatação e a maior interação eletrostática das regiões carregadas da proteína podem ter colaborado intensamente na precipitação com acetona. Desta forma, a precipitação com acetona foi um método muito superior aos outros métodos devido ao efeito combinado do solvente orgânico e dos íons da solução de sulfitólise.

Para que todas as precipitações pudessem ter sido realizadas diretamente na solução de sulfitólise, a alta concentração de ureia teve que ser diluída na razão de 1:4. Alguns autores relataram que uma concentração de pelo menos 4 M é necessária para aumentar a solubilidade da queratina e obter maiores rendimentos de extração [26,92]. Portanto, a redução da concentração de ureia de 8 para 2 M foi crucial para reduzir a solubilidade da queratina e permitir uma melhor atuação dos agentes precipitantes.

Outra vantagem importante da precipitação KAT é em relação ao tratamento dos resíduos de solução gerados após a obtenção da queratina. Para as precipitações isoelétricas, a neutralização do pH é fundamental antes de seu descarte [111,123]. Conseqüentemente, assim como a precipitação KSC, a

solução resultante se torna salina, dificultando a posterior reciclagem dos reagentes. Por outro lado, a acetona possui um baixo ponto de ebulição (56 °C) que facilita a sua reciclagem por roto-evaporação. A solução resultante após a remoção da acetona seria composta essencialmente por ureia, metabissulfito de sódio não reagido e aminoácidos e peptídeos que não foram capazes de precipitar. Tal solução poderia ser reutilizada após a concentração dos reagentes de partida ser corrigida. Essa estratégia de tratamento de resíduo é vital na redução do custo e da pegada ambiental da extração de queratina, como será mais bem discutido a partir dos resultados da ACV.

A análise elementar da pena CCF e das queratinas estão apresentadas na Tabela 5.1. Os teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio das penas estão em concordância com a literatura [78]. É observado que a queratina extraída apresentou menor teor de carbono e hidrogênio, os quais podem ser atribuídos à oxidação dos resíduos de cisteína em sais de Bunte ($-S-SO_3^-$) que contribuiria para um aumento no teor de enxofre e oxigênio.

Tabela 5.1 - Composição elementar das penas de frango limpas (CCF) e queratinas precipitadas por ácido clorídrico (KHA), ácido cítrico (KCA), cloreto de sódio (KSC) e acetona (KAT). Médias acompanhadas pela mesma letra não diferem significativamente pelo método de Tukey ($p > 0,05$).

Amostra	C (%)	H (%)	N (%)
CCF	48,44 ± 0,78 ^a	6,75 ± 0,07 ^a	14,48 ± 0,16 ^a
KHA	46,50 ± 0,21 ^b	4,79 ± 0,11 ^b	17,86 ± 0,22 ^b
KCA	45,24 ± 0,06 ^{bd}	4,18 ± 0,06 ^c	18,76 ± 0,11 ^{bd}
KSC	35,83 ± 0,21 ^c	4,38 ± 0,10 ^{cd}	20,35 ± 0,27 ^c
KAT	44,07 ± 0,45 ^d	4,51 ± 0,03 ^{bd}	19,37 ± 0,39 ^d

Houve um aumento no conteúdo de nitrogênio ao avaliar as queratinas independentemente do método de precipitação, o que inviabilizou a quantificação do teor de proteína das amostras. O aumento do nitrogênio pode estar associado a presença de ureia como impureza nas amostras. A ureia residual também foi observada na literatura quando a queratina foi extraída

juntamente com esse agente desnaturante, mesmo quando purificada por diálise [9,123]. Outro fator que pode ter contribuído para o teor de N é à composição de aminoácidos, os quais poderiam ser mais ricos em nitrogênio, como a arginina e a histidina (Figura 2.2). O teor de carbono para a KSC foi muito inferior do que as outras amostras, o que é um indício de que o NaCl utilizado na precipitação pode também ter sido incorporado à queratina. Caso isso ocorra, para se manter o nível de nitrogênio obtido na análise, esta amostra teria uma proporção maior de ureia residual.

A distribuição de massa molar (MWD) de um polímero influencia diversas de suas propriedades, como resistência mecânica e estabilidade térmica. As MWD das queratinas foram avaliadas por SDS-PAGE e as migrações se encontram na Figura 5.2.

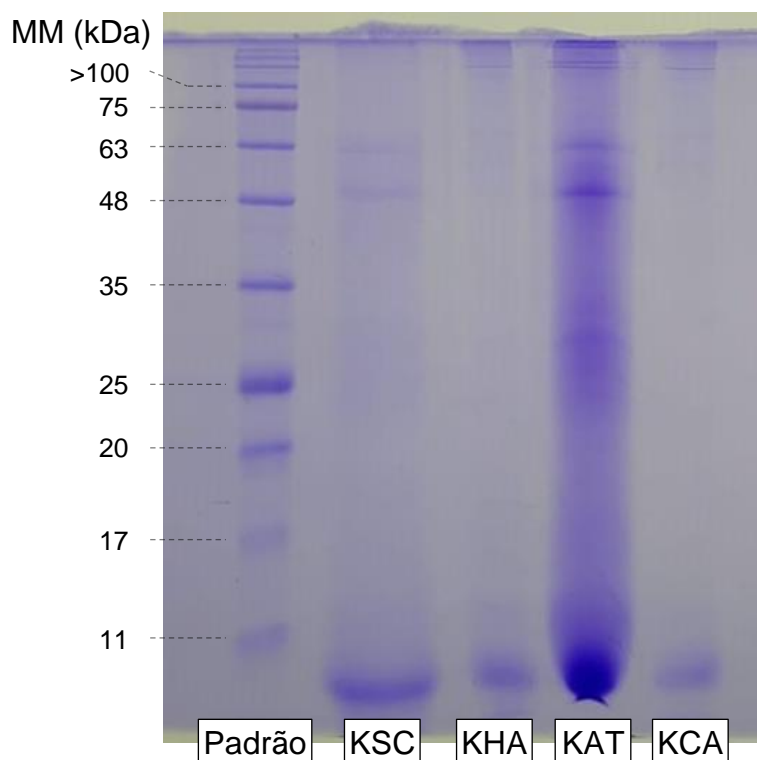


Figura 5.2 - Eletroforese em gel das queratinas precipitadas por ácido clorídrico (KHA), ácido cítrico (KCA), cloreto de sódio (KSC) e acetona (KAT). Massa molar (MM) foi calculada pela distância percorrida pelas bandas.

Os padrões de SDS-PAGE ilustram que todas as amostras exibiram bandas fortes de queratina de baixa massa molar, abaixo de 11 kDa, o que é típico da queratina de penas de frango [152]. De acordo com o banco de dados UniProt, é possível relacionar esta banda de baixa massa molar com as queratinas 1, 2, 3 e 4 da espécie *Gallus Gallus*, com as sequências do GenBank sendo AAA48930, CAA25085, CAA35555 e CAA35556, respectivamente. Tais proteínas possuem 98 aminoácidos e massa molar entre 9 e 11 kDa, sugerindo que essa banda pode corresponder a um conjunto de proteínas intimamente relacionadas, em vez de um único tipo de queratina.

As amostras de KSC e KAT apresentaram bandas mais fracas em torno dos padrões 48 e 60 kDa, o que indica que a extração de sulfitolise em condições mais brandas possivelmente preservou a cadeia polipeptídica da queratina. Queratinas com esta faixa de massa molar são geralmente associadas às α -queratinas, as quais apresentam massa molar entre 40 e 65 kDa [153]. Estas bandas não foram observadas para as amostras precipitadas por ácido, o que pode estar relacionado a um maior *pI* dessas frações de queratina. Outra possibilidade seria que a ureia interferisse durante as precipitações por ácido, mas não por acetona ou NaCl. Além disso, a amostra KAT exibiu uma banda fraca entre 20 e 35 kDa e, assim como a KHA e KCA, bandas acima de 100 kDa. Estes resultados contribuem com a alta eficiência da acetona em precipitar queratina de penas de frango, devido à recuperação de cadeias proteicas com uma gama de massas molares.

A análise quantitativa do SDS-PAGE foi realizada pela distância percorrida das bandas (Apêndice D1) e pelo método de áreas (Apêndice D2), e estão listadas na **Erro! Fonte de referência não encontrada..** As queratinas KHA e KCA tiveram mais de 95% de sua massa representada por cadeias menores que 10 kDa, comum para queratina de pena de frango [61]. Por outro lado, as queratinas KSC e KAT apresentaram proteínas com uma diversidade de massas molares maiores.

Com a precipitação de cadeias maiores, as amostras KSC e KAT apresentaram um índice de polidispersividade (IP) maior em relação as queratinas obtidas por precipitação isoelétrica. É importante destacar também

que essa fração de cadeias maiores podem apresentar uma composição de aminoácidos distinta, o que resultaria em possíveis alterações nas propriedades do material. Além disso, a queratina KAT apresentou uma massa molar média relativamente maior do que as outras amostras, corroborando com a maior eficiência atingida com este método de precipitação (Figura 5.1).

Tabela 5.2 - Bandas visíveis e suas respectivas intensidades, massa molar numérica média (M_n), massa molar ponderada média (M_w) e índice de polidispersividade (IP) das queratinas precipitadas por ácido clorídrico (KHA), ácido cítrico (KCA), cloreto de sódio (KSC) e acetona (KAT).

Amostra	Banda (kDa)	Área (%)	M_n (kDa)	M_w (kDa)	IP (M_w/M_n)																														
KHA	9,3	97,4	9,5	12,4	1,30																														
	129,4	2,6				KCA	9,2	97,2	9,4	12,3	1,30	121,4	2,8	KSC	8,7	89,2	9,5	14,1	1,48	54,6	5,6	64,0	5,1	KAT	10,1	69,7	13,1	21,0	1,60	29,3	14,4	54,6	11,3	64,9	3,8
KCA	9,2	97,2	9,4	12,3	1,30																														
	121,4	2,8				KSC	8,7	89,2	9,5	14,1	1,48	54,6	5,6		64,0	5,1				KAT	10,1	69,7	13,1		21,0	1,60				29,3	14,4	54,6	11,3	64,9	3,8
KSC	8,7	89,2	9,5	14,1	1,48																														
	54,6	5,6																																	
	64,0	5,1				KAT	10,1	69,7	13,1	21,0	1,60	29,3	14,4	54,6	11,3	64,9	3,8	125,5	0,4		151,3	0,4													
KAT	10,1	69,7	13,1	21,0	1,60																														
	29,3	14,4																																	
	54,6	11,3																																	
	64,9	3,8																																	
	125,5	0,4																																	
	151,3	0,4																																	

5.2 Caracterização estrutural das queratinas

As mudanças estruturais das penas de frango e das queratinas foram avaliadas por difratometria de raios-X (DRX). A Figura 5.3 mostra padrões de difração típicos de queratina, nos quais a estrutura hélice- α é identificada pela reflexão em aproximadamente 9° e a estrutura de folha- β em torno de 20° [61,84,138].

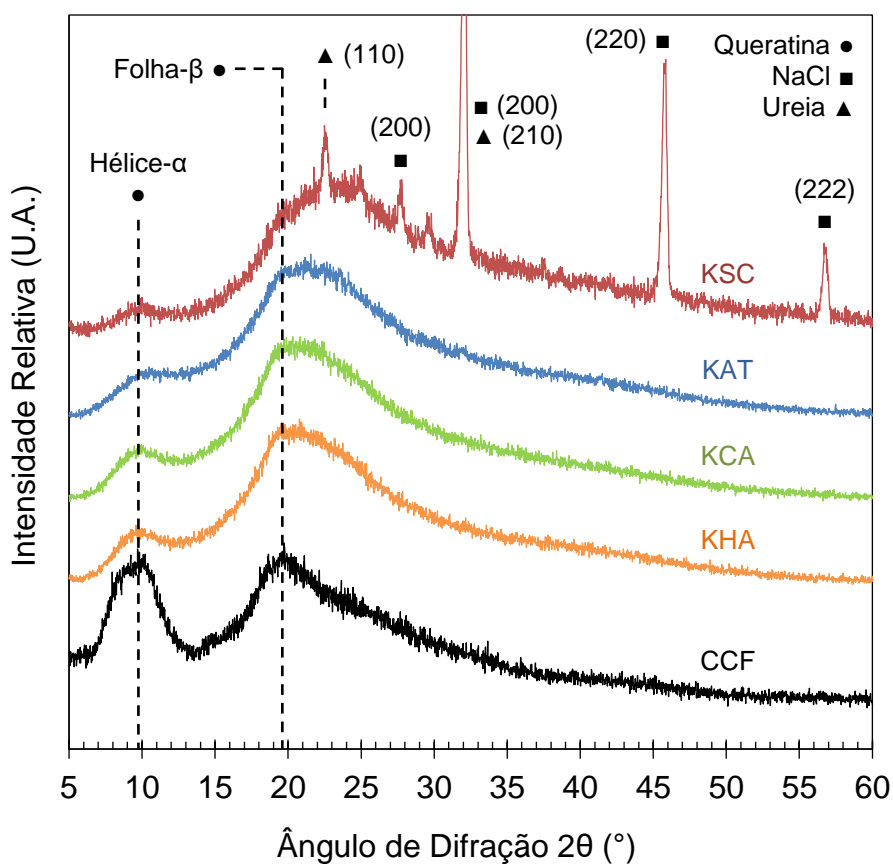


Figura 5.3 - Padrões de difração de raios-X das penas de frango (CCF, preto) e queratinas precipitadas por ácido clorídrico (KHA, laranja), ácido cítrico (KCA, verde), cloreto de sódio (KSC, vermelho) e acetona (KAT, azul).

Os padrões das queratinas precipitadas apresentaram menor intensidade para a reflexão correspondente à hélice- α quando comparadas às penas de frango, sugerindo que essa estrutura secundária não conseguiu recristalizar após a sulfitolise. Por outro lado, as reflexões referentes à folha- β praticamente mantiveram sua intensidade, porém apresentando um alargamento assimétrico. Estes resultados são indícios de que a queratina perdeu parte da sua cristalinidade. A redução do teor de hélice- α é amplamente reportada na literatura [27,99,154]. Acredita-se que a quebra das ligações dissulfeto desestabilize essa estrutura secundária em prol da reorganização das cadeias em forma de folhas- β . Outro fator que influencia na menor cristalinidade das queratinas é a formação dos resíduos de S-sulfocisteína, os quais possuem

grupos laterais mais volumosos que dificultariam a recristalização por efeito estérico.

O padrão de difração da queratina KSC apresentou picos intensos que podem ser atribuídos à ureia [43] e ao cloreto de sódio [155]. A presença desses reagentes pode ter sido causada pela grande concentração de ureia e NaCl em solução, os quais representaram uma razão aproximada de 35:1 e 15:1 em relação a massa de queratina precipitada, respectivamente. Além disso, os precipitados foram formados inicialmente em forma de gel, aprisionando parte da solução de sulfitolise. Outro fator relevante a ser considerado é a carga negativa da queratina em pH neutro, que favorece sua interação com os íons Na^+ . Ressalta-se que todas as queratinas foram submetidas a 2 ciclos de lavagem com centrifugação, conforme descrito no item 4.4 da metodologia. A presença de resíduos de extração e precipitação KSC é um indicativo de que o procedimento de purificação da queratina precisa ser otimizado em estudos futuros. Em contrapartida, é possível afirmar que um bom grau de pureza foi atingido para as queratinas KHA, KCA e KAT, uma vez que reflexões associadas à ureia ou ácido cítrico não foi observado nos difratogramas dessas amostras.

A Figura 5.4 mostra os espectros ATR-FTIR para as CCF e para as queratinas precipitadas. Foi observado quatro bandas características da queratina: amida A ($3000\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$); amida I ($1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$); amida II ($1500\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$); e amida III ($1200\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$) [122]. A banda larga centrada de 3275 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento das ligações O-H e N-H, principalmente relacionadas às ligações peptídicas da proteína e moléculas de água [78]. A banda da amida I apareceu em cerca de 1625 cm^{-1} e é causada pelo estiramento de C=O, a qual também pode ser atribuída principalmente às ligações peptídicas da queratina [36]. A banda da amida II localizada aproximadamente em 1520 cm^{-1} está relacionada com a deformação angular fora do plano da ligação N-H e estiramento C-N [156,157]. A banda da amida III foi encontrada por volta de 1230 cm^{-1} e está relacionada a modos vibracionais mais complexos que incluem vibrações de C=O, N-H e C-N [131,156,157]. Outras bandas importantes podem ser encontradas na faixa de 2800 a 3000 cm^{-1} e em

1445 cm^{-1} , relacionadas aos estiramentos assimétrico e simétrico da ligação C–H e à deformação angular de C–H, respectivamente [131,158].

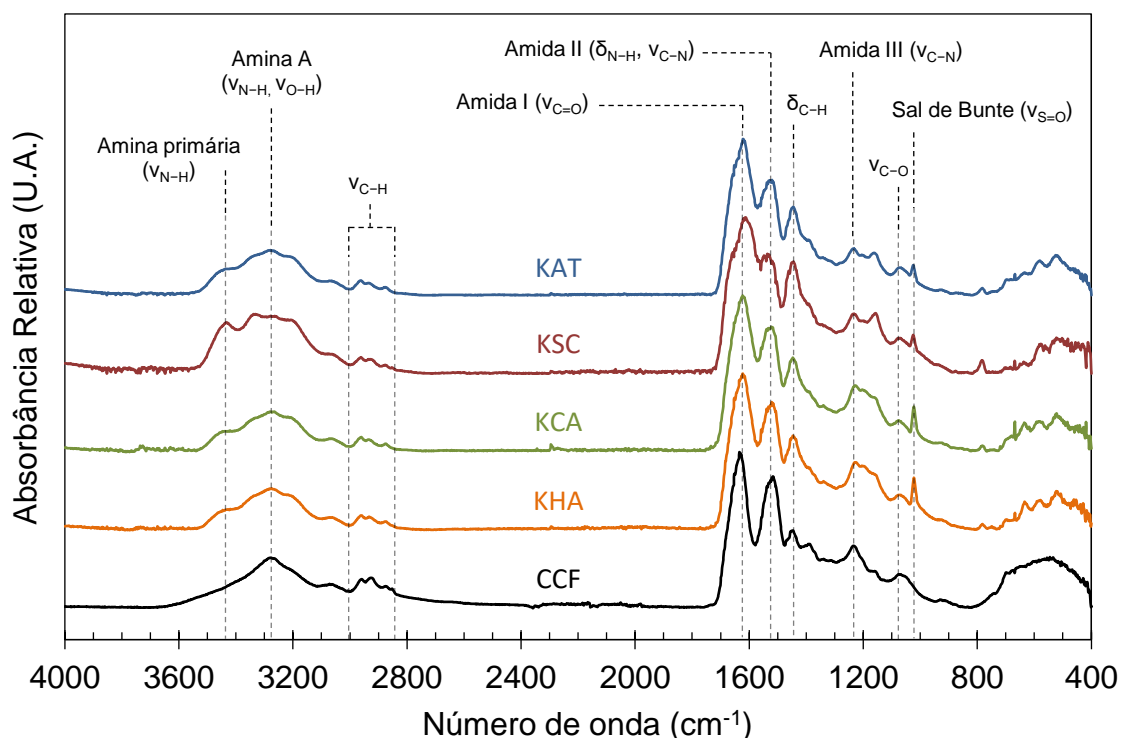


Figura 5.4 - Espectros ATR-FTIR das penas de frango (CCF, preto) e queratinas precipitadas com ácido clorídrico (KHA, laranja), ácido cítrico (KCA, verde), cloreto de sódio (KSC, vermelho) e acetona (KAT, azul).

Existe uma clara diferença entre as queratinas e CCF em relação à banda vibracional em 1022 cm^{-1} . As queratinas precipitadas apresentaram uma banda nítida que corresponde à vibração de estiramento simétrico S=O [127,136]. Essa mudança estrutural ocorreu devido à clivagem de resíduos de cistina para resíduos de cisteína (–SH) e S-sulfocisteína (–S–SO₃⁻) durante a extração por sulfitolise. Resíduos de ureia para as amostras de queratina podem ser identificados pela banda em torno de 3450 cm^{-1} , referente ao estiramento da ligação N–H de uma amina primária.

Uma característica ausente em todos os espectros foi a banda de estiramento das ligações C=O de grupos ésteres. Esta banda poderia ter sido observada em 1740 cm^{-1} e representaria a presença de lipídios na amostra

[78,159]. Assim, é possível concluir que a limpeza da gordura das penas de frango com etanol foi eficiente. Outro ponto a se observar é a ausência de absorções em 1040 cm^{-1} , que estaria relacionada a formação de ácido cisteico ($-\text{SO}_3\text{H}$) ao invés de sal de Bunte [116,160]. A ausência de ácido cisteico indica que a sanitização com NaClO não causou a oxidação prematura das ligações dissulfeto. Este resultado pode estar relacionado a alta resistência química das fibras de queratina, a menor concentração de agente oxidante e ao curto período de contato com as penas em comparação com métodos de extração oxidativos.

A estabilidade térmica é um aspecto importante para o processamento da queratina e, portanto, uma análise termogravimétrica foi realizada em atmosfera de ar sintético (20% O_2 e 80% N_2), e as curvas TG e DTG estão disponíveis na Figura 5.5. As perdas de massa e as temperaturas de início de degradação térmica estão listadas no Apêndice E.

A curva termogravimétrica das penas de frango apresentou três perdas de massa. Primeiramente, ocorreu a evaporação de água até $150\text{ }^\circ\text{C}$, representando uma perda de umidade de 7,6%. Em seguida, a pena se decompôs entre 200 e $440\text{ }^\circ\text{C}$, perdendo cerca de 54,2% de massa e se convertendo em resíduo carbonáceo. Por fim, uma última decomposição foi observada acima de $440\text{ }^\circ\text{C}$, e pode ser relacionada à decomposição do resíduo carbonáceo formado a partir do passo anterior.

As queratinas precipitadas, por outro lado, apresentaram quatro perdas de massa. Inicialmente, ocorreu a perda de umidade até $105\text{ }^\circ\text{C}$. Em seguida, duas decomposições ocorreram entre $105 - 225\text{ }^\circ\text{C}$ e $225 - 420\text{ }^\circ\text{C}$, e podem ser atribuídas a degradação das cadeias poliméricas da queratina [161]. Por último, o resíduo carbonáceo formado nas decomposições anteriores foi degradado acima de $420\text{ }^\circ\text{C}$.

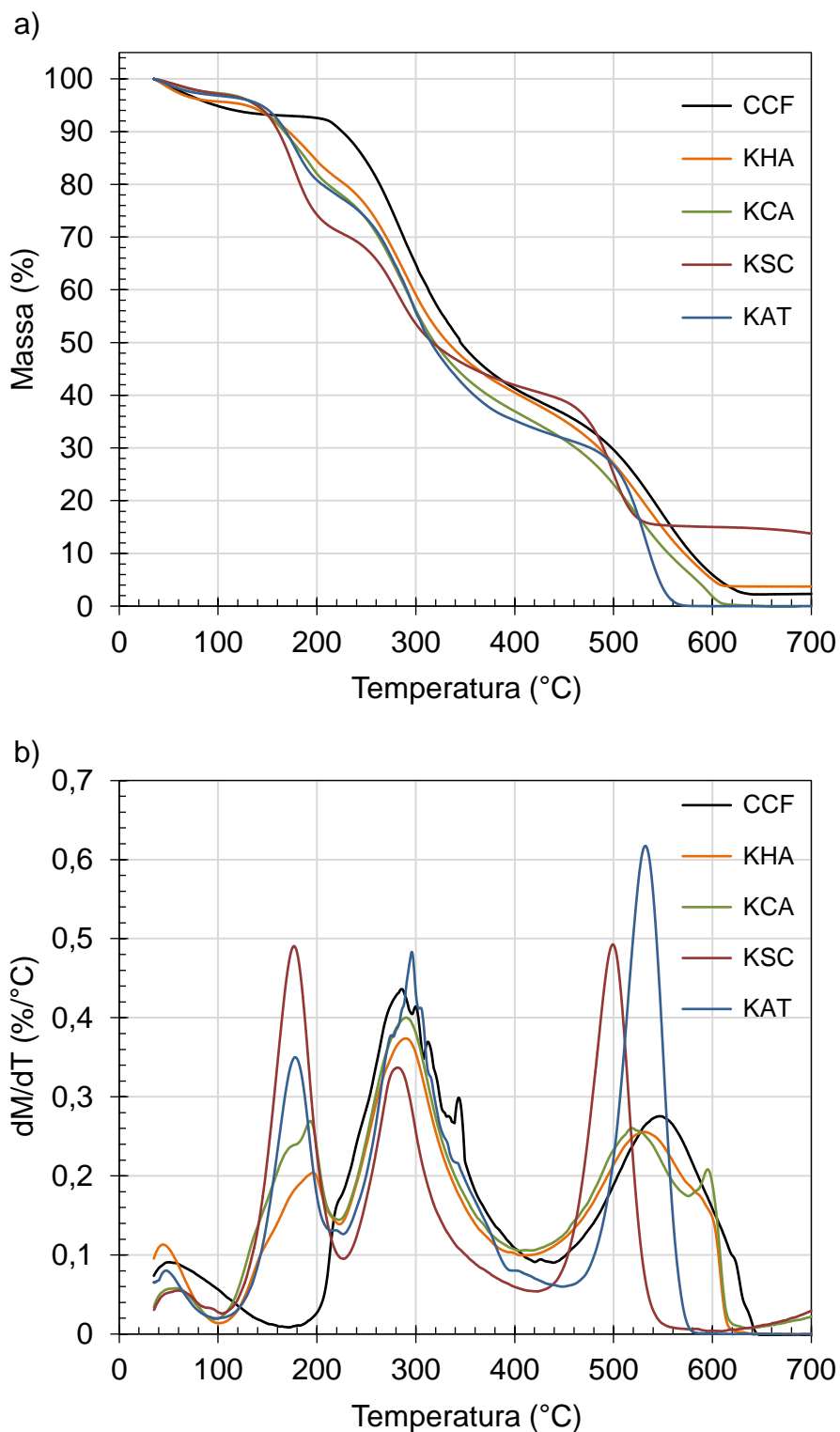


Figura 5.5 - Análise termogravimétrica das penas de frango (CCF, preto) e queratinas precipitadas por ácido clorídrico (KHA, laranja), ácido cítrico (KCA, verde), cloreto de sódio (KSC, vermelho) e acetona (KAT, azul). (a) Curvas termogravimétricas e (b) curvas termogravimétricas derivadas.

Os resultados da TGA mostraram que a degradação térmica da queratina ocorre em temperaturas mais baixas em comparação com as penas de frango. A menor estabilidade térmica dos precipitados pode estar associada a quebra das ligações cruzadas da queratina, assim como menor cristalinidade e presença de cadeias de menor massa molar [125,161]. Desta forma, o processamento da queratina deve ocorrer em temperaturas idealmente inferiores a 130 °C para evitar qualquer degradação do material. Este resultado está coerente com a literatura, onde processamentos com temperatura superior a 130 °C degradaram a proteína [150].

A queratina KSC apresentou $11,7 \pm 2,1\%$ de cinzas (3 repetições). Como a análise foi realizada em atmosfera de ar sintético, qualquer composto de carbono foi decomposto pela alta temperatura e, assim, essa quantidade de cinzas pode ser atribuída essencialmente a algum resíduo inorgânico. Portanto, as cinzas da amostra KSC pode ser atribuída ao NaCl residual, que também foi identificado por DRX.

Os resultados apresentados até o momento confirmam a possibilidade de se recuperar a queratina extraída de resíduos de penas de frango com agentes de precipitação simples. Um destaque pode ser dado ao potencial da precipitação com acetona (KAT), através da qual foi possível obter queratina de maior massa molar, com boa pureza e com alto rendimento. Todavia, é importante entender se o uso da acetona contribui ambientalmente para o conceito de valorização da queratina, mediante indicadores de impacto ambiental, comparativamente aos outros agentes de precipitação. Este entendimento foi aprofundado através da avaliação do ciclo de vida (ACV) conforme discutido a seguir.

5.3 Avaliação de ciclo de vida

Os resultados relativos da ACV das produções de queratina estão apresentados na Figura 5.6. Todos os indicadores de impacto ambiental estudados neste trabalho estão disponíveis em valores absolutos no Apêndice F.

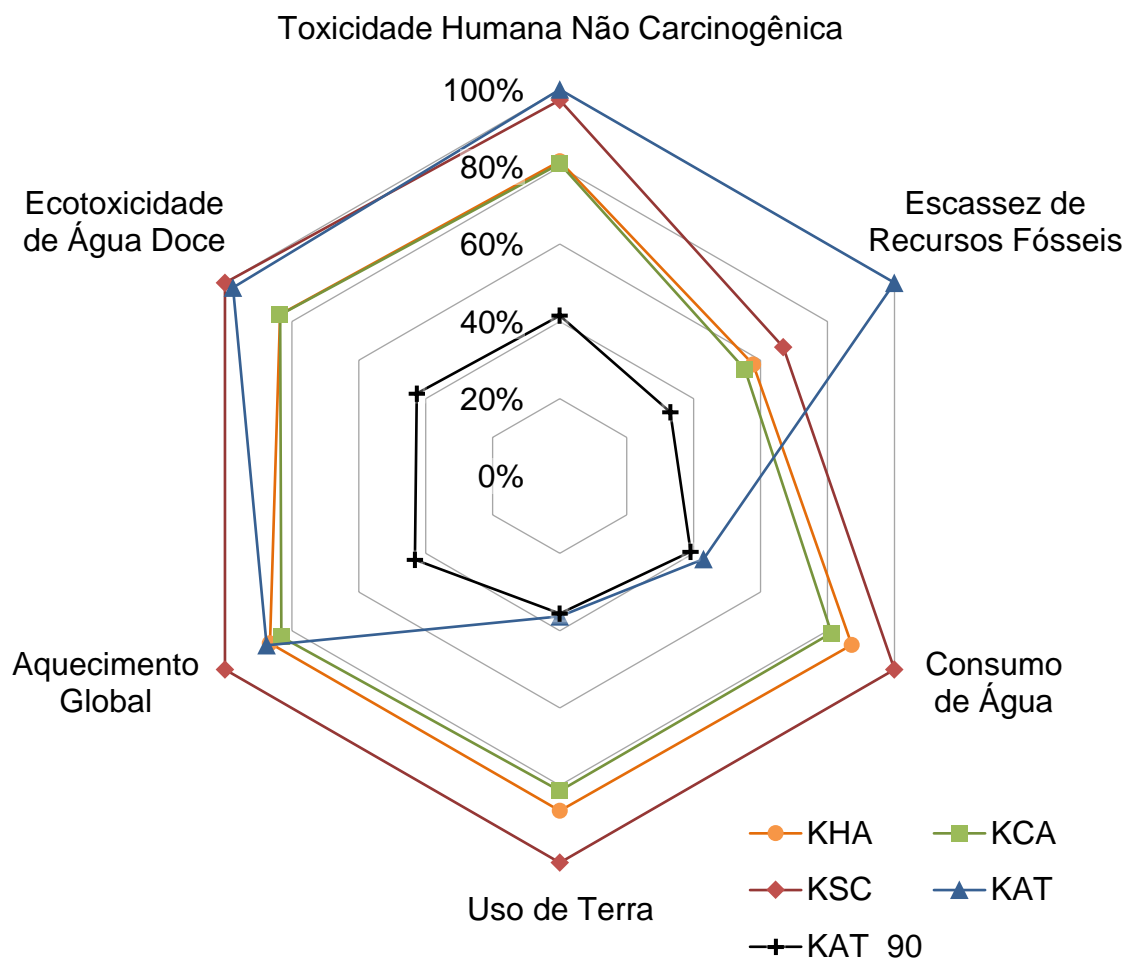


Figura 5.6 - Resultados relativos da avaliação do ciclo de vida da queratina de penas de frango extraída por sulfitolise e precipitada com ácido clorídrico (KHA, ● laranja), ácido cítrico (KCA, ■ verde), cloreto de sódio (KSC, ◆ vermelho) e acetona sem (KAT, ▲ azul) e com reciclagem de 90% (KAT_90, + preto).

É possível notar que a precipitação KSC foi o método de se obter queratina com indicadores mais elevados considerando as categorias de aquecimento global (GLWM), consumo de água (WTRC), ecotoxicidade de água doce (FWTX) e uso de terra (LAND). No geral, o desempenho ambiental inferior deste método é altamente influenciado pelo seu baixo rendimento de recuperação (27,7%), já que um menor rendimento aumenta diretamente a quantidade de insumos químicos e energia para obter a mesma quantidade de queratina (unidade funcional de 1 tonelada de queratina). Comparativamente, as

precipitações KHA e KCA apresentaram indicadores ambientais aproximadamente 20% menores do que a precipitação KSC, o que é proporcional ao aumento de rendimento da precipitação (32 e 34,8%, respectivamente).

A precipitação KAT apresentou desempenho ambiental semelhante àqueles das precipitações isoelétricas em relação à categoria GLWM, enquanto os indicadores toxicidade humana não carcinogênica (HNTX) e a FWTX foram semelhantes àqueles estimados para a precipitação KSC. Uma vantagem altamente relevante reside nos indicadores consumo de água (WTRC) e LAND, os quais foram drasticamente reduzidos em relação aos outros métodos de precipitação. Desta forma, o volume de acetona necessário para precipitar a queratina é compensado pelo alto rendimento da precipitação, gerando vantagens ambientais para esta rota de obtenção de queratina a partir de penas de frango. Contudo, para o indicador escassez de recursos fósseis (FSRS), a precipitação KAT apresentou o pior desempenho ambiental, conforme mostrado na Figura 5.6. Tal resultado é um indicativo de uma alta relação da cadeia produtiva da acetona com fonte não renováveis em relação aos demais agentes de precipitação.

As contribuições, em valores absolutos, de cada etapa ou processo modelado para os indicadores representados na Figura 5.6 foram discriminadas com o intuito de identificar os gargalos ambientais no ciclo de vida das queratinas precipitadas. Pode ser notado na Figura 5.7 que os processos “produção das aves”, “pré-tratamento das penas” e “sulfitolise” agregam mais de 84% de todo o impacto ambiental estimado para todas as categorias, principalmente para os ciclos de vida englobando as precipitações KHA, KCA e KSC.

O processo “produção de aves” teve uma contribuição significativa para o indicador LAND. Tal processo compreende uma cadeia produtiva que requer grande quantidade de água e energia, principalmente para cultivar as culturas que compõem a ração dos animais, como milho, trigo e soja [162]. O mesmo pode ser dito para o processo “pré-tratamento”, o qual envolve o uso de etanol de fonte sucroalcooleira como agente sanitizante (ver seção 4.2). Essas etapas relacionadas à atividade agrícola contribuem consideravelmente para todas as

categorias de impacto ambiental, especialmente no que diz respeito ao uso de terras devido às extensas áreas de cultivo necessárias para atender às demandas das diferentes culturas e biomassas.

A sulfitolise contribui para os impactos ambientais, devido à energia requerida para manter a temperatura durante o processo de extração e à considerável quantidade de ureia utilizada. A ureia é uma carbamida produzida a partir de dióxido de carbono (CO_2) e amônia (NH_3) e envolve processos intensivos em energia [163]. Ambas as matérias-primas também são obtidas de fontes fósseis, como carvão e gás natural, a partir de processos tradicionais, como o Haber-Bosch (Apêndice A) [164].

Os processos de “precipitação” foram relevantes apenas para a precipitação KAT, representando 57% de contribuição para os indicadores, exceto LAND e WTRC. A acetona considerada na ACV foi produzida através da desidrogenação do isopropanol. Este processo consiste na produção de acetona e gás hidrogênio (H_2) a partir de um catalisador aquecido [165]. O isopropanol, por sua vez, é produzido pela combinação de água e propeno em uma reação de hidratação que exige muita energia, particularmente durante as reações químicas em alta temperatura e processos de separação [166].

Devido à grande contribuição da acetona na pegada ambiental da queratina KAT, o efeito que a sua taxa de reciclagem teria nos ecoindicadores foi estudado através de uma análise de sensibilidade. As simulações foram realizadas considerando apenas a retroalimentação do processo de precipitação com acetona reciclada, diminuindo a demanda por acetona primária, e sem considerar o consumo energético da recuperação do solvente.

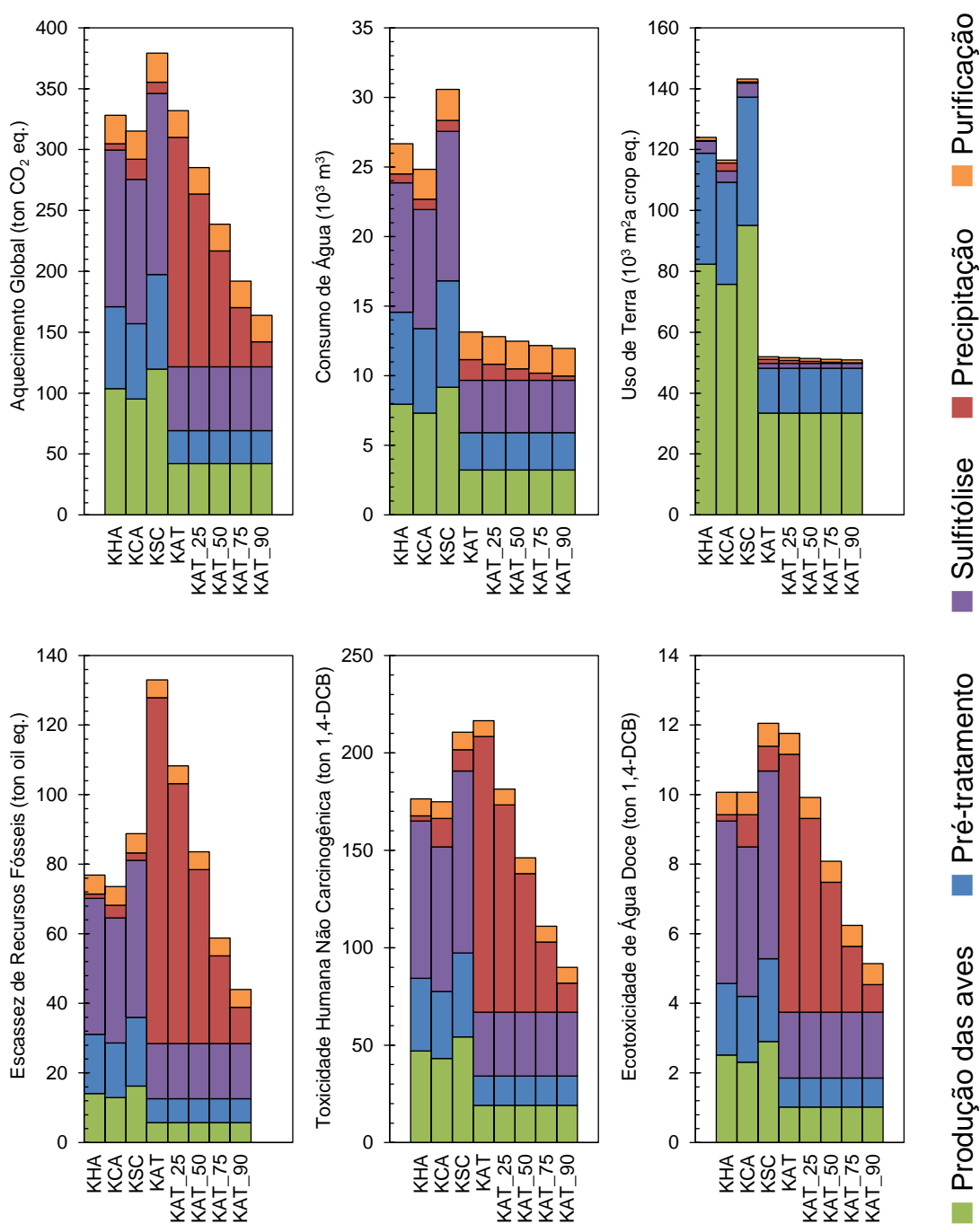


Figura 5.7 - Algumas categorias de impacto ambiental em valores absolutos de cada conjunto de processos que compreendem a produção de queratina extraída por sulfitólise e precipitada com ácido clorídrico (KHA), ácido cítrico (KCA), cloreto de sódio (KSC) e acetona com diferentes frações de reciclagem (acetona pura = KAT, 25% = KAT_25, 50% = KAT_50, 75% = KAT_75, 90% = KAT_90).

Os resultados absolutos da análise de sensibilidade, assumindo taxas de reciclagem entre 25 a 90%, foram incluídos na Figura 5.7, enquanto o resultado relativo para a maior taxa de recuperação (90%) foi incluído na Figura 5.6. Os ecoindicadores WTRC e LAND não foram impactados significativamente com a recuperação de acetona, o que era esperado já que a precipitação KAT teve o melhor desempenho ambiental nessas categorias. Entretanto, uma redução considerável foi observada nos outros indicadores. De acordo com a Figura 5.7, a reciclagem de 50% de acetona já seria suficiente para reduzir em média 32% da contribuição da “precipitação” nas categorias de impacto ambiental. Esta porcentagem de reciclagem de acetona seria suficiente para que a queratina KAT tivesse uma pegada ambiental comparável ou menor que os outros métodos. Por outro lado, o reaproveitamento de 90% de acetona, além de plausível em processos industriais, seria capaz de cortar em média 76% das contribuições, fornecendo uma pegada ambiental consideravelmente menor do que os outros métodos de precipitação, como pode ser visto na Figura 5.6.

Além de reduzir a pegada ambiental, a reciclagem da acetona possibilitaria a diminuição de custos da produção de queratina. Adicionalmente, a remoção da acetona da solução de sulfitolise resultaria em uma solução contendo ureia, metabissulfito de sódio não reagido e aminoácidos e peptídeos produzidos durante a extração. Esta solução poderia ter sua concentração de ureia e agente redutor ajustada para ser igual à utilizada inicialmente, podendo ser reaproveitada em novas extrações. O reuso dessa solução resultaria na diminuição da quantidade de ureia empregada e, conseqüentemente, reduziria drasticamente os potenciais impactos ambientais do ciclo de vida da queratina.

Assim, os resultados da ACV da queratina reforçam, de forma inédita na literatura, a importância da adoção de processos que permitam uma economia circular, no que tange não somente o reaproveitamento da queratina das penas de frango, mas também dos diversos insumos químicos utilizados na sua extração e precipitação. Ressalta-se também que a ACV realizada neste trabalho contemplou processos em escala de laboratório. Estudos futuros de ACV serão necessários para confirmar as tendências de impacto ambiental

observadas no contexto de produção de queratina em escala industrial otimizada.

5.4 Caracterização morfológica e estrutural dos filmes biodegradáveis

Nas próximas seções, são apresentados os resultados de caracterização dos filmes biodegradáveis de queratina produzidos por termo-prensagem. O objetivo principal foi avaliar como o tipo de precipitação afeta as propriedades físicas dos filmes obtidos. Estudos neste sentido ainda não estão disponíveis na literatura científica.

A produção dos filmes biodegradáveis se deu após uma lavagem mais rigorosa dos particulados de queratina com o intuito de remover completamente o resíduo de ureia, e a sua ausência foi verificada por FTIR na próxima seção. A queratina liofilizada tinha a capacidade de absorver um grande volume de água devido à estrutura porosa deixada após a liofilização. A possível reoxidação de resíduos de cisteína em ligações dissulfeto [97], devido ao contato entre cadeias durante a precipitação, também podem ter permitido essa característica dos precipitados. A absorção de água pela queratina foi explorada para simplificar o processamento dos filmes. Conforme descrito na seção 4.5, a solução de glicerol foi rapidamente absorvida pela proteína, permitindo a incorporação e ação do plastificante. Assim, a queratina foi capaz de ser conformada por termo-prensagem a 120 °C.

Apesar da associação típica da queratina com termofixos devido ao seu alto teor de ligações dissulfeto, os métodos de sulfitolise e de oxidação podem tornar o comportamento reológico da queratina similar ao de polímeros termoplásticos. Esses métodos de extração quebram e oxidam as ligações dissulfeto, resultando na formação de sal de Bunte ou ácido cisteico (Figura 2.19 e Figura 2.18, respectivamente). A quebra das ligações cruzadas e a estabilização dos grupos sulfidrilas impedem que as cadeias peptídicas se reticulem novamente, dando maior mobilidade as cadeias e permitindo o processamento em altas temperaturas. A termo-prensagem produziu filmes transparentes e flexíveis, como é possível observar na Figura 5.8. Os filmes produzidos com queratina isoeletricamente precipitada (KHA e KCA)

apresentaram uma leve tonalidade amarelada, enquanto os filmes obtidos por *salting out* (KSC) e acetona (KAT) foram praticamente incolores. Tais características denotam uma qualidade estética superior dos filmes obtidos em relação a outros desenvolvidos da literatura, os quais apresentaram forte coloração amarelada, possivelmente devido à degradação química e/ou termomecânica da queratina, Figura 5.8b-d.

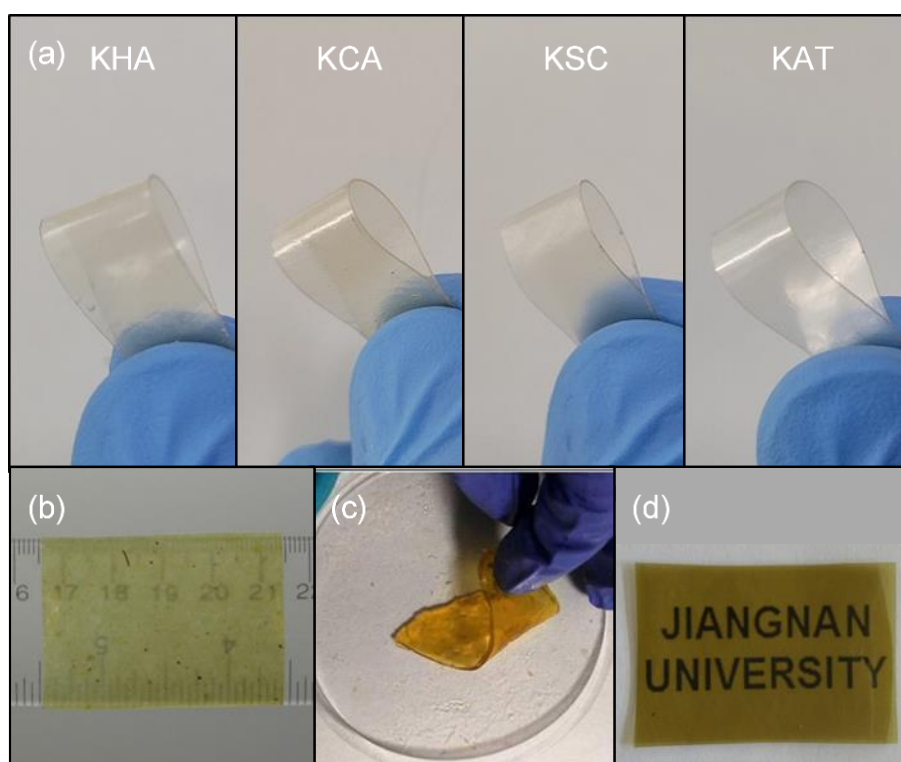


Figura 5.8 - Aspecto visual dos (a) filmes biodegradáveis de queratina termoplástica (25% glicerol) e comparativo com filmes obtidos (b) por hidrólise alcalina (NaOH) e termo-prensagem (20% glicerol) [167], (c) por redução (Na_2S) seguido de solubilização (NaOH) e *casting* de solução (3,5% de glicerol e 0,2% celulose microcristalina) [168], e (d) por redução (L-cisteína) e *casting* de solução (10% glicerol) [61].

A termo-prensagem permitiu a obtenção de filmes visivelmente uniformes e com superfície lisa ao tato. A morfologia interna dos filmes foi avaliada por MEV-FEG das fraturas criogênicas, e as micrografias foram reunidas na Figura 5.9. Todos os filmes de queratina apresentaram uma matriz contínua, sem a

presença de grãos não plastificados. Este resultado demonstra o caráter termoplástico das amostras, em que a adição de glicerol e água durante a termoprensagem permitiram a plastificação da queratina. Vale ressaltar também que a sulfitólise diminuiu a quantidade de ligações cruzadas com a formação de resíduos de S-sulfocisteína ($-S-SO_3^-$), identificado por ATR-FTIR (Figura 5.4). O caráter hidrofílico destes resíduos também pode ter contribuído para a plasticidade da queratina, devido a maior compatibilidade com o glicerol.

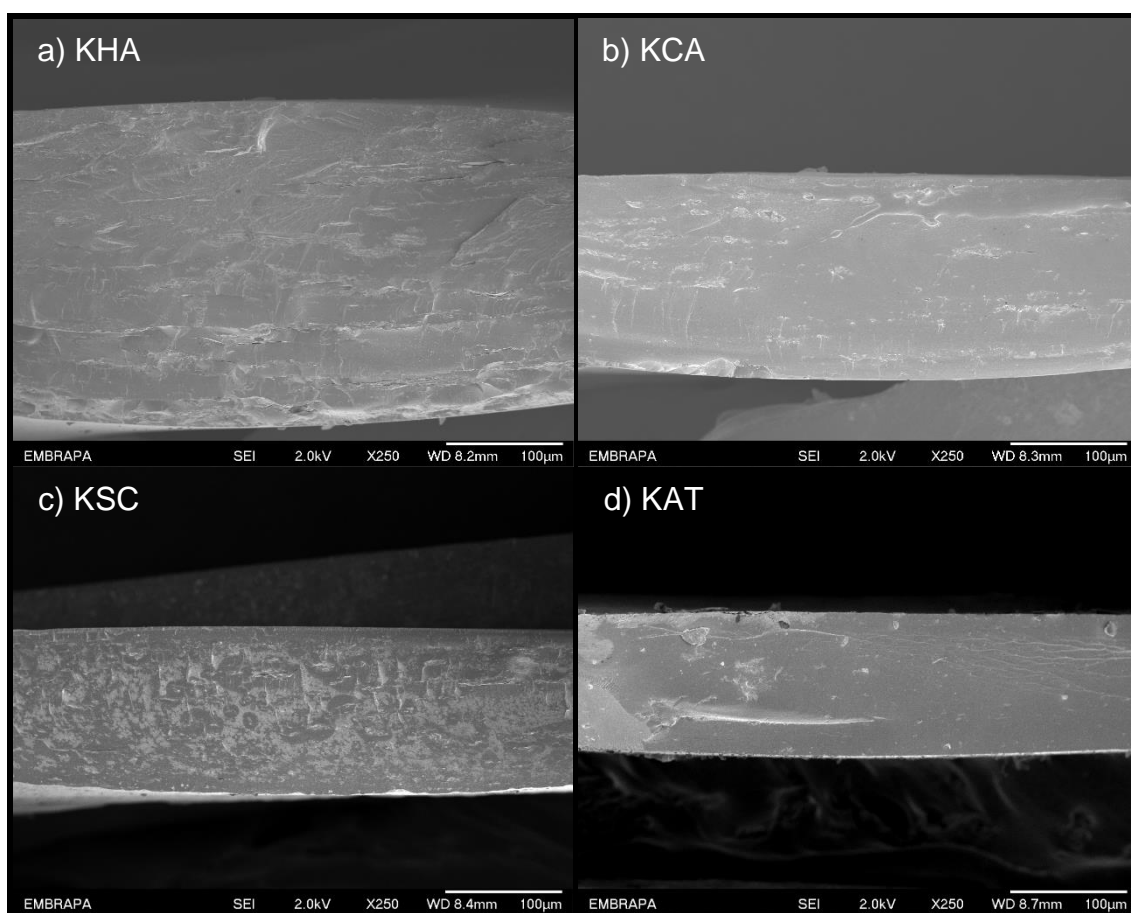


Figura 5.9 - Micrografias por MEV-FEG das fraturas criogênicas dos filmes de queratina precipitada por (a) ácido clorídrico (KHA), (b) ácido cítrico (KCA), (c) cloreto de sódio (KSC) e (d) acetona (KAT).

Uma diferença notável entre os filmes foi que a queratina KSC apresentou uma morfologia bifásica, Figura 5.9c, que pode ser atribuída a domínios ricos em queratina e domínios ricos em NaCl. O surgimento dessa morfologia bifásica pode estar relacionado à presença de NaCl residual nos precipitados KSC

(Figura 5.5). Com a adição da solução de glicerol, os íons do sal podem ter sido resolubilizados e induzido um efeito de *salting out* durante a etapa de absorção de plastificante. Esse fenômeno pode ter contribuído para a separação de domínios ricos em queratina e em NaCl-glicerol, devido ao aumento da interação queratina-queratina promovida pelo sal.

A Figura 5.10 mostra os espectros ATR-FTIR das penas de frango e dos filmes de queratina. Assim como nos espectros ATR-FTIR das queratinas precipitadas (Figura 5.4), os filmes também apresentaram as quatro bandas características de queratina. Ao ser comparada com a pena de frango, a banda da Amida I dos filmes apresentou um deslocamento em direção a números de onda mais baixos (*red-shift*). O mesmo fenômeno também foi observado para os precipitados e é uma indicação que houve um aumento na proporção de folha- β na microestrutura tanto nas queratinas precipitadas quanto dos filmes.

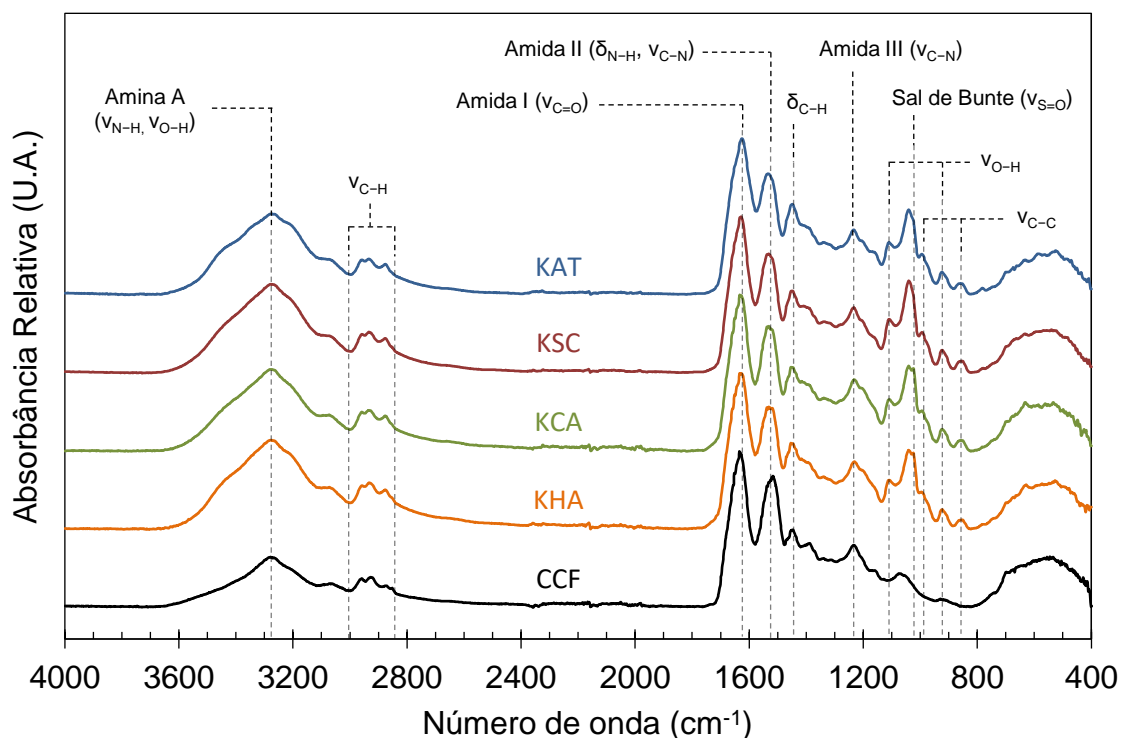


Figura 5.10 - Espectros FTIR das penas de frango (CCF, preto) e filmes de queratina precipitada por ácido clorídrico (KHA, laranja), ácido cítrico (KCA, verde), cloreto de sódio (KSC, vermelho) e acetona (KAT, azul).

Apesar dos espectros apresentarem um padrão típico em proteínas, existem diferenças notáveis relacionadas à adição de glicerol. Os filmes de queratina apresentaram bandas em 1110 e 923 cm^{-1} , que podem ser atribuídas ao estiramento das ligações O–H em álcoois secundários e à deformação angular das ligações O–H, respectivamente [169,170]. O ombro em 995 cm^{-1} e a banda em 860-850 cm^{-1} podem ser atribuídos às vibrações de C–C da cadeia principal do glicerol [170], enquanto o ombro observado em 1420-1400 cm^{-1} pode ser atribuído às vibrações de deformação das ligações C–O–H [169]. O aumento da absorvância nesses números de onda pode ter sido causado pela incorporação do glicerol. A banda em 1025 cm^{-1} , que foi atribuída ao estiramento simétrico das ligações S=O do sal de Bunte [127,136], foi sobreposta para os filmes de queratina. A banda $\nu_{\text{S=O}}$ se apresentou como um ombro de outra banda localizada entre 1080 e 1000 cm^{-1} , que possivelmente está associada a deformação angular das ligações O–H do glicerol.

A intensidade da banda Amida A é principalmente afetada pelas vibrações do estiramento de grupos N–H que interagem por ligações de hidrogênio [14]. Como essa banda não é significativamente afetada pela conformação da estrutura principal do polipeptídeo, é possível associar a sua intensidade com a quantidade de ligações de hidrogênio que o material faz com moléculas de água [78]. Dada a maior absorção observada nessa região, é possível sugerir que os filmes de queratina plastificados com glicerol apresentaram maior hidrofiliçidade. Além disso, o formato dessa banda se manteve inalterado em comparação com o espectro das penas de frango, confirmando que a ureia foi essencialmente removida da queratina antes da termo-prensagem dos filmes.

A cristalinidade desempenha um papel importante nas propriedades mecânicas de polímeros semicristalinos [66,115] e, portanto, o grau de cristalinidade dos filmes foi avaliado tanto por DRX quanto por ATR-FTIR. Conforme mostrado na Figura 5.11, os filmes de queratina apresentaram padrões de difração semelhantes àqueles obtidos por DRX das queratinas precipitadas (Figura 5.3). O padrão semicristalino com duas reflexões largas em ângulos de difração de 9° e 20°, podem ser atribuídos às estruturas secundárias de hélice- α e folha- β , respectivamente [61,84,138]. Assim como para os

precipitados, os padrões de difração dos filmes mantiveram menor intensidade do pico em 9° , sugerindo que o processamento da queratina não permitiu a recristalização total da estrutura de hélice- α , presente anteriormente nas penas de frango.

A perda da estrutura de hélice- α também tem sido relatada na literatura para filmes de queratina extraídas tanto por sulfitolise [168] quanto por métodos de redução [61]. Este fenômeno é geralmente associado à quebra de ligações dissulfeto [154], e não aos métodos de precipitação. Entretanto, é importante ressaltar que o glicerol também aumenta o volume livre entre as cadeias poliméricas, o que poderia interferir na dinâmica de cristalização do material.

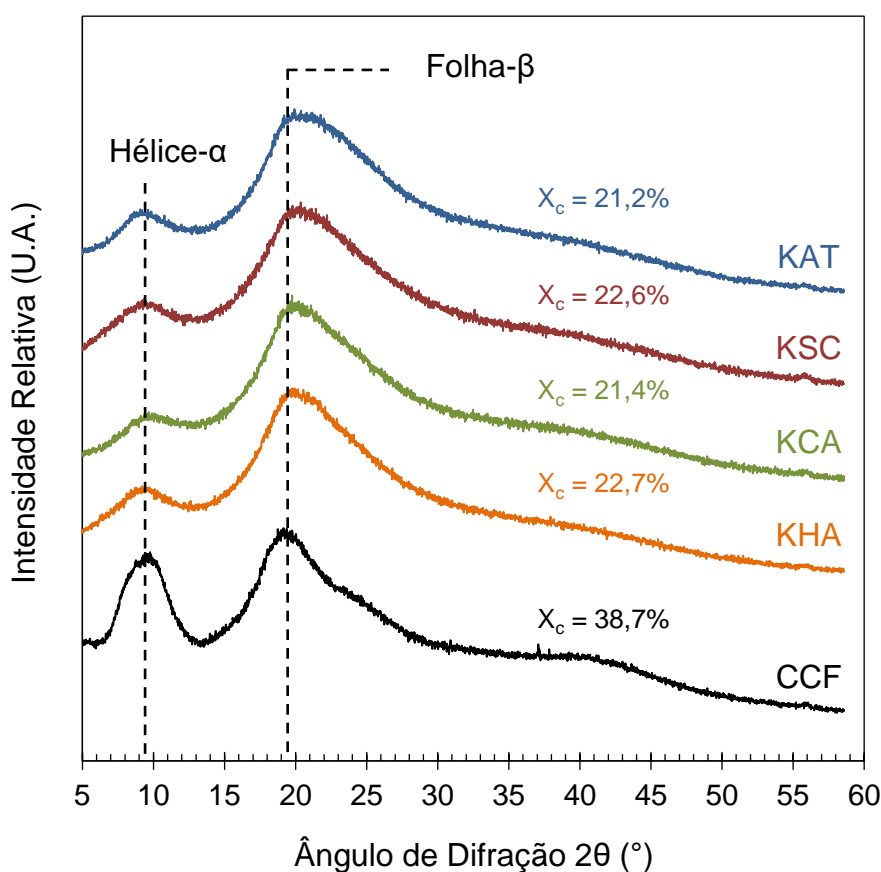


Figura 5.11 - Padrões de difração de raios-X das penas de frango (CCF, preto) e filmes de queratina precipitada por ácido clorídrico (KHA, laranja), ácido cítrico (KCA, verde), cloreto de sódio (KSC, vermelho) e acetona (KAT, azul).

O pico de difração correspondente à estrutura de folha- β apresentou alargamento assimétrico em direção a ângulos de difração mais altos, como também observado para os precipitados. Esse alargamento pode estar relacionado à presença de um halo amorfo sobreposto em 25° , conforme relatado por Xie *et al.* (2005) em seu estudo sobre queratina de lã amorfa [124]. Além disso, Azmi *et al.* (2018) associaram esse pico mais amplo à sobreposição do pico de folha- β e de dobra- β , uma estrutura secundária considerada amorfa [171]. Embora o motivo desse alargamento ainda esteja em aberto pela literatura, a cristalinidade da amostra seria reduzida em ambos os casos. O filme KSC não apresentou picos de difração referentes ao NaCl, como observado para os precipitados. Entretanto, estes íons ainda podem estar dispersos pela matriz do polímero ou associados aos resíduos de aminoácidos carregados, como o ácido aspártico e glutâmico (Figura 2.2).

O grau de cristalinidade e as frações de estrutura secundária foram obtidos pelo método de deconvolução a partir dos resultados de DRX e FTIR. Os resultados foram listados na Tabela 5.3 e as deconvoluções estão disponíveis no Apêndice G. A espectroscopia FTIR é capaz de estimar a cristalinidade de proteínas, devido a característica da banda Amida I ser majoritariamente influenciada pela vibração das estruturas secundárias da proteína em vez dos grupos laterais de seus aminoácidos [78]. Deste modo, essa banda é amplamente utilizada para análise da estrutura secundária a partir da técnica de deconvolução com curvas gaussianas/lorentzianas.

Ambos os métodos indicaram que tanto os precipitados quanto os filmes apresentaram menor cristalinidade em comparação com as penas de frango. As queratinas perderam entre 40 e 50% de sua cristalinidade, o que pode ser atribuído predominantemente pela desestabilização da estrutura hélice- α após a sulfitolise, como discutido anteriormente. Os filmes de queratina apresentaram grau de cristalinidade ligeiramente superior ao das partículas, porém ainda bem inferior ao das penas. O processamento pode ter contribuído para esse leve aumento de cristalinidade dos filmes, em que a temperatura elevada da termoprensagem pode ter permitido a reorganização das cadeias poliméricas, já que se encontra acima da temperatura de transição vítrea da queratina [139].

Tabela 5.3 - Comparação das frações de estrutura secundária e cristalinidade entre as metodologias de deconvolução. Penas de frango (CCF) e queratinas precipitadas (Prec.) ou em filme por ácido clorídrico (KHA), ácido cítrico (KCA), cloreto de sódio (KSC) e acetona (KAT).

Amostra	FTIR			DRX		
	Hélice- α	Folha- β	X _c	Hélice- α	Folha- β	X _c
CCF	17,6	23,3	41,0	16,2	22,6	38,7
Prec. KHA	4,5	12,6	17,1	4,4	14,5	18,9
Prec. KCA	4,3	13,0	17,3	3,6	14,5	18,2
Prec. KSC	4,6	13,0	17,5	1,8	15,6	17,4
Prec. KAT	2,0	14,7	16,8	3,2	14,3	17,5
Filme KHA	5,5	14,4	20,0	4,3	18,4	22,7
Filme KCA	5,8	14,6	20,5	3,2	18,2	21,4
Filme KSC	6,4	14,9	21,3	4,3	18,3	22,6
Filme KAT	8,6	14,3	22,9	4,0	17,2	21,2

5.5 Propriedades físicas dos filmes biodegradáveis

A resistência à tração, alongamento na ruptura, módulo de elasticidade e tenacidade estão apresentados na Tabela 5.4. A resistência à tração permaneceu estatisticamente similar para todas as amostras. Por outro lado, o alongamento na ruptura, o módulo elástico e a tenacidade dos filmes dependeram estatisticamente do método de precipitação.

As queratinas KHA e KCA resultaram em filmes mais rígidos e menos elásticos. Essas propriedades mecânicas podem ser atribuídas à presença de ligações iônicas entre as cadeias de queratina devido ao mecanismo de precipitação isoelétrica (Figura 2.9). Neste método de precipitação, o pH da solução de sulfitolise é ajustado para ser igual ao pI da proteína. Neste pH, a carga líquida das cadeias de queratina se aproxima de zero, resultando em uma diminuição da repulsão eletrostática entre as cadeias proteicas. Esta condição permite a atração eletrostática entre os grupos carregados positivamente e negativamente nas superfícies das proteínas, ocasionando sua aglomeração.

Para os filmes KCA, qualquer ácido cítrico residual também poderia ter formado ligações cruzadas covalentes através da esterificação em altas temperaturas [167], limitando a mobilidade das cadeias de queratina e aumentando a fragilidade mecânica dos filmes. Por outro lado, o HCl não tem efeito reticulante em proteínas devido ao caráter monovalente do íon Cl^- . Assim, o menor alongamento na ruptura do filme KCA em relação ao filme KHA pode ser explicado pelo possível efeito reticulante de ácido cítrico residual.

Tabela 5.4 - Propriedades mecânicas dos filmes de queratina de penas de frango a 25 °C e 54% de umidade relativa. Resistência à tração (σ_{UTS}), alongamento na ruptura (ϵ_{break}), módulo elástico (E) e tenacidade (U_T). Médias acompanhadas pela mesma letra não diferem significativamente pelo método de Tukey ($p > 0,05$).

Amostra	σ_{UTS} (MPa)	ϵ_{break} (%)	E (MPa)	U_T (MJ/m³)
KHA	11,7 ± 2,5 ^{ab}	22,3 ± 8,0 ^a	412,9 ± 115,7 ^a	2,3 ± 1,3 ^{ab}
KCA	11,3 ± 1,7 ^{ab}	9,6 ± 3,5 ^b	468,2 ± 99,6 ^a	1,4 ± 0,2 ^a
KSC	12,4 ± 1,8 ^a	56,3 ± 5,7 ^c	210,2 ± 48,0 ^b	5,0 ± 0,9 ^c
KAT	8,7 ± 1,1 ^b	74,1 ± 3,3 ^d	41,3 ± 5,0 ^c	3,6 ± 0,6 ^{bc}

Os filmes KSC e KAT apresentaram maior comportamento plástico, como indicado pelos maiores ϵ_{break} e menores módulos de elasticidade. Esse fenômeno pode ser atribuído à predominância de interações de van der Waals entre as cadeias, presença de cadeias de maior massa molar e índice de polidispersividade ligeiramente maior. As interações de van der Waals entre as regiões hidrofóbicas da proteína foram formadas durante a precipitação, resultando em um material mais flexível devido a menor energia de ligação em comparação com as ligações iônicas presentes nas amostras KHA e KCA. Além disso, a liberdade de uma cadeia polimérica tende a aumentar com o seu comprimento, já que um maior número de rotações das ligações da cadeia seria permitido. Por outro lado, um índice de polidispersividade maior aumenta a mobilidade das cadeias poliméricas, devido ao aumento do volume livre causado pelas cadeias mais curtas [36,62]. Portanto, a maior mobilidade molecular,

combinada com a adição de glicerol, contribuiu para a produção de filmes menos rígidos que foram capazes de maiores alongamentos. Curvas de tração típicas dos filmes de queratina se encontram na Figura 5.12.

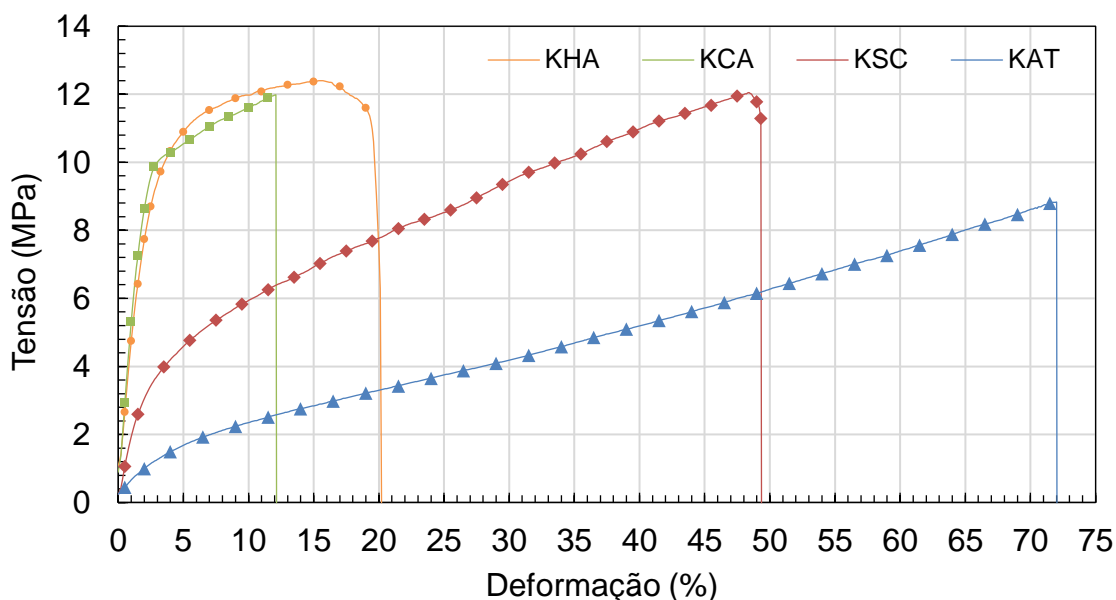


Figura 5.12 - Curvas de tração típicas dos filmes de queratina precipitada por ácido clorídrico (KHA, laranja), ácido cítrico (KCA, verde), cloreto de sódio (KSC, vermelho) e acetona (KAT, azul).

As propriedades mecânicas dos filmes de queratina obtidos neste trabalho foram consideravelmente maiores quando comparadas às propriedades de filmes obtidos por *casting* de solução reportados na literatura [22,132]. Devido à alta temperatura, o processamento de termo-prensagem pode ter rearranjado as ligações dissulfeto [36,150]. Além disso, resíduos livres de cisteína que permaneceram quebrados após a extração também poderiam se reoxidar com maior rapidez em novas ligações cruzadas [36,150]. Essas características da termo-prensagem podem ter contribuído para a produção de filmes de queratina mais compactos e reticulados com propriedades mecânicas superiores em comparação com os produzidos por *casting* de solução (Tabela 2.2).

Os filmes de queratina demonstraram transparência e um aspecto visual excepcional em comparação com filmes de queratina reportados na literatura (Figura 5.8). Não foi observado nenhuma rachadura ou partículas insolúveis na

superfície do filme. Os resultados da colorimetria estão apresentados na Tabela 5.5, juntamente com os resultados comparativos de penas de frango com e sem branqueamento oxidativo obtidos por Tesfaye et al. (2017) [11]. Todas as amostras apresentaram alta transparência, acima de 85%, e parâmetros de cor semelhantes àqueles obtidos pelo branqueamento da pena de frango. Os filmes de KHA e KCA exibiram um leve tom amarelado, identificado pelo maior valor da coordenada cromática +b (amarelo). Essa característica foi muito mais sutil nos filmes de KSC e praticamente ausente nos filmes de KAT, ambos incolores a olho nu.

Tabela 5.5 - Parâmetros de cor no sistema CIELab dos filmes de queratina e resultados comparativos de resíduo de pena de frango antes e após a purificação com NaClO ou H₂O₂. Luminosidade (L), transparência (T), e coordenadas cromáticas a (a < 0, verde) e b (b > 0, amarelo). Médias acompanhadas pela mesma letra não diferem significativamente pelo método de Tukey (p > 0,05).

Amostra	L	a	b	T (%)
KHA	85,0 ± 0,6 ^a	-1,6 ± 0,1 ^a	8,0 ± 0,9 ^a	86,9 ± 0,4 ^a
KCA	85,3 ± 0,5 ^a	-1,7 ± 0,1 ^a	7,9 ± 0,5 ^a	86,3 ± 0,8 ^a
KSC	87,6 ± 0,7 ^b	-1,1 ± 0,0 ^b	4,7 ± 0,1 ^b	86,6 ± 0,4 ^a
KAT	88,3 ± 0,6 ^b	-0,8 ± 0,1 ^c	2,6 ± 0,3 ^c	91,1 ± 1,1 ^b
Resíduo [11]	75,4	2,8	19,6	-
Pena (NaClO) [11]	92,3	0,1	4,0	-
Pena (H ₂ O ₂) [11]	94,6	0,4	5,9	-

A coloração amarelada observada em queratinas precipitadas isoeletricamente (KHA e KCA) pode ser atribuída a vários fatores. O ácido cítrico e o ácido clorídrico podem ter causado hidrólise ácida da queratina durante a precipitação. Essa condição ácida pode ter degradado alguns aminoácidos e formado compostos de dupla ligação que atuam como cromóforos amarelos [172]. É importante ressaltar ainda que o parâmetro b é bem inferior ao encontrado nas penas do resíduo antes de um processo de branqueamento.

Dependendo do perfil de aminoácidos da queratina, a termo-prensagem também pode ter causado o amarelamento por degradação térmica. A

decomposição da cisteína e da tirosina, bem como a oxidação do triptofano, ocorre em altas temperaturas. Essas reações levam à formação de cromóforos amarelos, como a quinurenina pela oxidação do triptofano, que ocorre em poucos minutos de exposição a altas temperaturas [173]. O amarelamento por termo-prensagem também foi observado por Katoh et al. (2004) ao utilizar queratina de lã de ovelha produzida por sulfitólise, mas purificada por diálise [150]. O mesmo fenômeno também foi observado para a queratina de cabelo quando exposta a uma temperatura de 81°C por várias horas [174].

O filme KAT apresentou a maior transparência, provavelmente associada à ausência de degradação durante a precipitação e processamento. O mesmo poderia ter sido dito para os filmes KSC, porém a presença de uma estrutura bifásica, como observado na Figura 5.9c, possivelmente causou o espalhamento da radiação incidente, interferindo nas propriedades óticas do filme.

A Figura 5.13 mostra os espectros UV-Vis dos filmes de queratina. Todas as amostras apresentaram transparência para os comprimentos de onda na região do visível, porém forte absorção de radiação ultravioleta. A absorção de radiação UV pode ser atribuída aos aminoácidos da queratina que possuem grupos cromóforos, geralmente ligações insaturadas de aminoácidos aromáticos. Os cromóforos mais significantes que absorvem radiação UVB são os aminoácidos tirosina ($\lambda_{\max} = 275 \text{ nm}$) e triptofano ($\lambda_{\max} = 280 \text{ nm}$), além da fenilalanina ($\lambda_{\max} = 255 \text{ nm}$) em menor intensidade [175,176]. Esses aminoácidos representam mais de 7% da composição de aminoácidos da queratina e contribuem intensamente para a propriedade de barreira à radiação UV. De maneira geral, os filmes de queratina apresentaram ótima transparência a luz visível e boa barreira contra UVA e UVB, sendo excelentes candidatos para embalagens de produtos sensíveis a luz, como alimentos e fármacos [177].

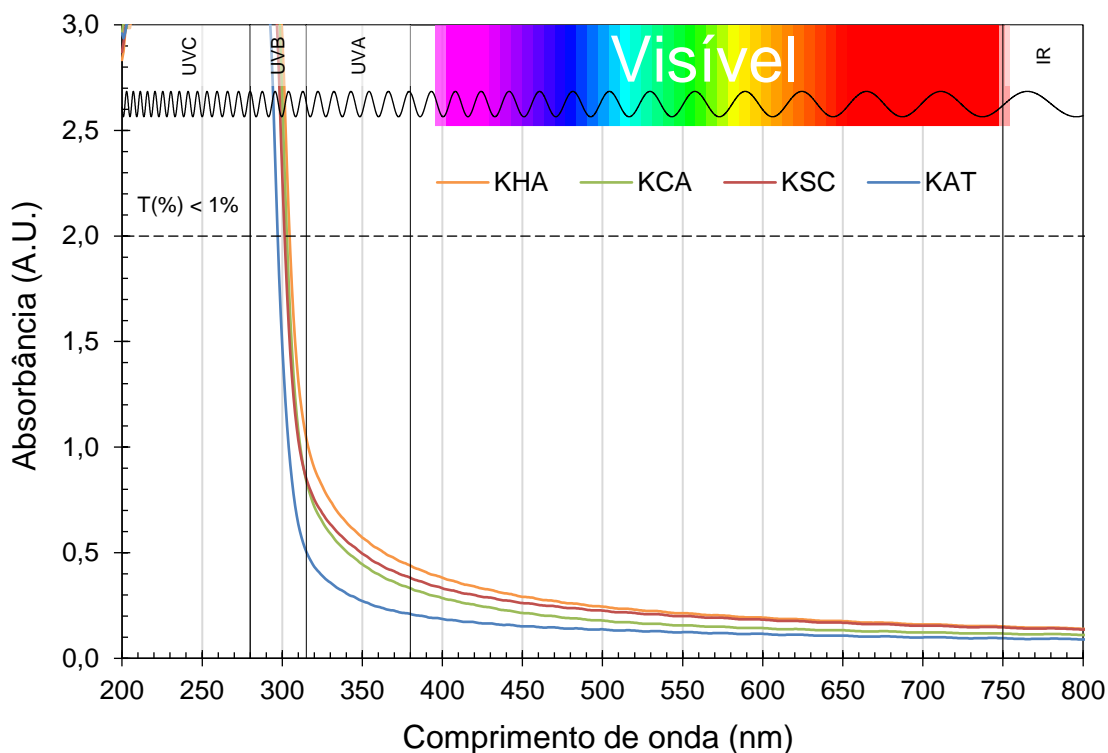


Figura 5.13 - Espectros de absorção UV-Vis dos filmes de queratina. Absorbância maior que 2 representa uma transmitância menor que 1%.

A estabilidade em contato com água é uma propriedade crucial para a aplicabilidade de filmes biodegradáveis como embalagens, como os produzidos a base de polissacarídeos e proteínas. Normalmente, estes filmes são solúveis em água, limitando o seu uso em diversas aplicações. Os filmes de queratina foram insolúveis em água e apresentaram uma capacidade de absorção de água (U_w) semelhante de aproximadamente 27%, exceto o filme KAT, que apresentou uma U_w de 11%, conforme mostrado na Tabela 5.6. A menor absorção de água do filme KAT pode ser atribuída ao ambiente químico durante a precipitação, no qual a adição de acetona reduziu significativamente a constante dielétrica (ϵ_r) do sistema. Esse ambiente químico mais apolar pode ter contribuído para a exposição de regiões hidrofóbicas da proteína, o que diminuiria a interação da queratina com a água. Após 24 horas de imersão dos filmes, as soluções aquosas continuaram neutras, indicando que não houve a liberação de compostos que alterariam o pH da solução, em especial para os filmes precipitados com HCl e ácido cítrico.

Tabela 5.6 - Estabilidade em água dos filmes de queratina de penas de frango. Teor de umidade (M), capacidade de absorção de água (U_w) e solubilidade em água (S_w). Médias acompanhadas pela mesma letra não diferem significativamente pelo método de Tukey ($p > 0,05$).

Amostra	M (%)	U_w (%)	S_w (%)
KHA	7,1 ± 0,5 ^a	27,2 ± 6,8 ^a	12,9 ± 1,0 ^a
KCA	7,5 ± 0,9 ^a	26,1 ± 5,7 ^a	16,2 ± 2,6 ^a
KSC	14,1 ± 1,1 ^b	27,7 ± 4,5 ^a	28,7 ± 1,2 ^b
KAT	11,1 ± 1,2 ^c	10,7 ± 3,4 ^b	28,8 ± 3,7 ^b

Em relação à solubilidade em água, os filmes KHA e KCA perderam cerca de 14% de sua massa, enquanto os filmes de KSC e KAT apresentaram aproximadamente 28% de massa solúvel. Grande parte da massa solúvel das amostras pode ser atribuída à perda de glicerol, o qual seria removido do filme após o inchamento do material e a entrada de água. Devido à predominância de ligações de van der Waals e índice de polidispersividade ligeiramente maior, pode-se sugerir que as amostras KSC e KAT apresentaram uma estrutura mais permeável a entrada de água e remoção de glicerol. Esta mesma tendência foi observada para os resultados de umidade, em que os filmes KSC e KAT apresentaram maior teor de umidade (14,1 e 11,1%, respectivamente) do que os filmes KHA e KCA (7,1 e 7,5%, respectivamente).

Apesar da adição de 20% (m/m_{total}) de glicerol, todos os filmes termoprensados apresentaram menor U_w e S_w em comparação com aqueles produzidos por *casting* de solução, mesmo sem adição de plastificante. Song *et al.* (2017) relataram 120% de capacidade de absorção de água, enquanto Moore *et al.* (2006) relataram $30,7 \pm 1,5\%$ de massa solúvel, ambos a partir de filmes de queratina pura produzidos por *casting* de solução [132,178].

A hidrofiliidade dos filmes de queratina foi avaliada por medições de ângulo de contato, como pode ser visto na Figura 5.14. Todos os filmes apresentaram comportamento hidrofílico, com ângulos de contato inferior a 90° . A hidrofiliidade dos filmes de queratina pode ser consequência tanto da adição de glicerol quanto da natureza da extração. A sulfitólise converte resíduos de

cisteína em sal de Bunte ($-S-SO_3^-$) que, aliado aos grupos hidroxilas ($-OH$) do glicerol, aumentam a afinidade da queratina com a água. O filme KAT exibiu o maior ângulo de contato ($52,5 \pm 3,1^\circ$) após 60 segundos em comparação com as outras amostras. Os filmes KHA e KSC apresentaram ângulos de contato em torno de 46° , enquanto os filmes KCA mostraram maior espalhamento da gota de água ($37,3 \pm 2,3^\circ$). Esses resultados são consistentes com a capacidade de absorção de água, sendo que os filmes KAT também demonstraram maior hidrofobicidade.

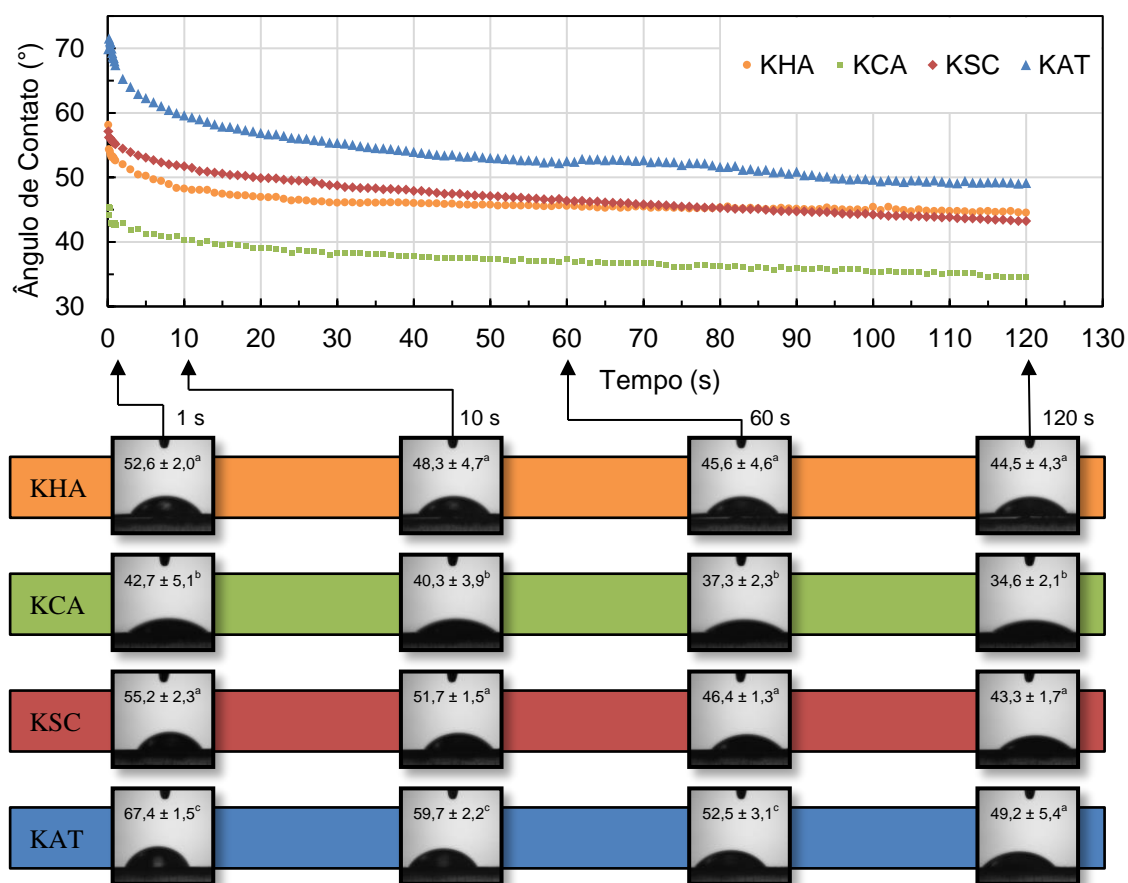


Figura 5.14 - Ângulo de contato dinâmico entre gotas de água de $5 \mu\text{L}$ e as superfícies dos filmes KHA (laranja ●), KCA (verde ■), KSC (vermelho ◆) e KAT (azul ▲). As imagens da esquerda para a direita são quadros individuais em 1, 10, 60 e 120 segundos, respectivamente. Médias acompanhadas pela mesma letra não diferem significativamente pelo método de Tukey ($p > 0,05$).

Os resultados apresentados nesta seção demonstram que a valorização dos resíduos de penas de frango por meio da produção de filmes termoplásticos de queratina foi alcançada com sucesso. Os filmes apresentaram alta transparência à luz ($T > 85\%$), ótima barreira contra UVA e UVB, menor solubilidade em água e maiores propriedades mecânicas em comparação com resultados da literatura. De modo geral, a precipitação KAT resultou em filmes de queratina com melhor balanço de propriedades, especialmente no que tange à maior flexibilidade e plasticidade para um mesmo nível de resistência mecânica, conforme revelado por testes de tração.

6 CONCLUSÕES

As principais conclusões desta tese de doutorado podem ser estabelecidas da seguinte forma:

- ✓ Foi possível obter queratina de pena de frango por meio da sulfitólise e os diferentes métodos de precipitação. A precipitação com solvente orgânico se mostrou o mais eficaz em precipitar queratina diretamente da solução de sulfitólise, sendo uma recuperação comparável às realizadas com membranas diálise mais rigorosas (MWCO < 8 kDa). A precipitação com acetona e *salting out* recuperaram frações de queratina com maior massa molar, o que é determinante para produção de filmes plásticos com melhores propriedades físicas.
- ✓ A avaliação do ciclo de vida mostrou que a precipitação com acetona tem as menores pegadas ambientais, principalmente quando o solvente orgânico é reciclado acima de 50%. As etapas de pecuária, pré-tratamento e sulfitólise foram as que mais contribuíram para a pegada ambiental. Dentre os fluxos de entrada, o uso de água, energia, ureia, álcool e acetona foram os principais gargalos ambientais da produção de queratina.
- ✓ A valorização dos resíduos de penas de frango provenientes da indústria avícola foi alcançada por meio da produção de filmes termoplásticos de queratina. As propriedades físicas dos filmes de queratina foram dependentes do método de precipitação devido ao efeito que o agente precipitante exerce sobre a físico-química das cadeias poliméricas da queratina.

Em suma, foi demonstrado que a precipitação pode ser uma purificação de queratina mais rápida e de baixo custo em comparação à diálise. Para a precipitação com solventes orgânicos, os subprodutos gerados durante a extração e precipitação seriam capazes de serem reciclados. Portanto, este estudo contribuiu para o desenvolvimento tecnológico de filmes de queratina de baixo custo, ecológicos e escalonáveis.

7 SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

- ❖ Avaliar o efeito dos agentes de extração e desnaturantes nas características estruturais e morfológicas da pena de frango em função do tempo de extração. Técnicas como a microtomografia de raios-X poderiam ser aplicadas para se obter *insights* sobre os mecanismos de inchamento da pena de frango que permitiriam a entrada dos agentes na estrutura compacta da pena de frango.
- ❖ Analisar os efeitos de outros agentes de precipitação na recuperação da queratina. Avaliar a combinação de métodos de precipitação com o intuito de obter um efeito sinérgico relevante para o rendimento.
- ❖ Verificar os efeitos que a precipitação teria quando a queratina é solubilizada pelo método de redução. A instabilidade dos grupos sulfidrila pode interferir nos mecanismos de precipitação, assim como nas características da queratina.
- ❖ Avaliar as propriedades do filme de queratina quando produzidos com plastificantes menos polares que o glicerol. O uso de plastificantes mais apolares podem aumentar a estabilidade em água do filme.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Food and Agriculture Organization of the United Nations, Food Outlook: Global Market Analysis, 2012.
- [2] Food and Agriculture Organization of the United Nations, Food Outlook - Biannual Report on Global Food Markets, FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2022. <https://doi.org/10.4060/CB9427EN>.
- [3] Organization for Economic Co-operation and Development, Food and Agriculture Organization of the United Nations, OECD - FAO Agricultural Outlook 2022-2031, OECD, 2022. <https://doi.org/10.1787/F1B0B29C-EN>.
- [4] S. Sharma, A. Gupta, S.M.S.T. Chik, C.G. Kee, B.M. Mistry, D.H. Kim, G. Sharma, Characterization of keratin microparticles from feather biomass with potent antioxidant and anticancer activities, *Int J Biol Macromol* 104 (2017) 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.015>.
- [5] M.G. Mothé, L.M. Viana, C.G. Mothé, Thermal property study of keratin from industrial residue by extraction, processing and application, *J Therm Anal Calorim* 131 (2018) 417–426. <https://doi.org/10.1007/s10973-017-6845-8>.
- [6] S.M. Martelli, J.B. Laurindo, Chicken feather keratin films plasticized with polyethylene glycol, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* 61 (2012) 17–29. <https://doi.org/10.1080/00914037.2011.557809>.
- [7] M. Casadesús, M.D. Álvarez, N. Garrido, G. Molins, J. Macanás, X. Colom, J. Cañavate, F. Carrillo, Environmental impact assessment of sound absorbing nonwovens based on chicken feathers waste, *Resour Conserv Recycl* 149 (2019) 489–499. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2019.06.009>.
- [8] F. Pourjavaheri, F. Mohaddes, R.A. Shanks, M. Czajka, A. Gupta, Effects of different purification methods on chicken feather keratin, *Adv Mat Res* 941–944 (2014) 1184–1187. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.941-944.1184>.

- [9] F. Pourjavaheri, S. Ostovar Pour, O.A.H. Jones, P.M. Smooker, R. Brkljača, F. Sherkat, E.W. Blanch, A. Gupta, R.A. Shanks, Extraction of keratin from waste chicken feathers using sodium sulfide and L-cysteine, *Process Biochemistry* 82 (2019) 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.04.010>.
- [10] M. Dąbrowska, A. Sommer, I. Sinkiewicz, A. Taraszkiwicz, H. Staroszczyk, An optimal designed experiment for the alkaline hydrolysis of feather keratin, *Environmental Science and Pollution Research* 29 (2021) 24145–24154. <https://doi.org/10.1007/S11356-021-17649-2/FIGURES/5>.
- [11] T. Tesfaye, B. Sithole, D. Ramjugernath, Valorisation of waste chicken feathers: Optimisation of decontamination and pre-treatment with bleaching agents using response surface methodology, *Sustain Chem Pharm* 8 (2018) 21–37. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2018.02.003>.
- [12] S. Feroz, N. Muhammad, J. Ranayake, G. Dias, Keratin-based materials for biomedical applications, *Bioact Mater* 5 (2020) 496–509. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.04.007>.
- [13] A. Shavandi, T.H. Silva, A.A. Bekhit, A.E.D.A. Bekhit, Keratin: Dissolution, extraction and biomedical application, *Biomater Sci* 5 (2017) 1699–1735. <https://doi.org/10.1039/c7bm00411g>.
- [14] D. Wang, X.-H. Yang, R.-C. Tang, F. Yao, Extraction of Keratin from Rabbit Hair by a Deep Eutectic Solvent and Its Characterization, *Polymers (Basel)* 10 (2018) 993. <https://doi.org/10.3390/polym10090993>.
- [15] T. Tesfaye, B. Sithole, D. Ramjugernath, V. Chunilall, Valorisation of chicken feathers: Characterisation of chemical properties, *Waste Management* 68 (2017) 626–635. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.06.050>.
- [16] K. Song, X. Qian, X. Li, Y. Zhao, Z. Yu, Fabrication of a novel functional CNC cross-linked and reinforced adsorbent from feather biomass for efficient metal removal, *Carbohydr Polym* 222 (2019) 115016. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2019.115016>.

- [17] H. Xu, Y. Yang, Controlled de-cross-linking and disentanglement of feather keratin for fiber preparation via a novel process, *ACS Sustain Chem Eng* 2 (2014) 1404–1410. <https://doi.org/10.1021/sc400461d>.
- [18] B. Mu, F. Hassan, Y. Yang, Controlled assembly of secondary keratin structures for continuous and scalable production of tough fibers from chicken feathers, *Green Chemistry* 22 (2020) 1726–1734. <https://doi.org/10.1039/c9gc03896e>.
- [19] R. Khajavi, M.K. Rahimi, M. Abbasipour, A.H. Brendjchi, Antibacterial nanofibrous scaffolds with lowered cytotoxicity using keratin extracted from quail feathers, *J Bioact Compat Polym* 31 (2016) 60–71. <https://doi.org/10.1177/0883911515598793>.
- [20] H. Mori, M. Hara, Transparent biocompatible wool keratin film prepared by mechanical compression of porous keratin hydrogel, *Materials Science and Engineering: C* 91 (2018) 19–25. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2018.05.021>.
- [21] Z. Sun, X. Chen, X. Ma, X. Cui, Z. Yi, X. Li, Cellulose/keratin-catechin nanocomposite hydrogel for wound hemostasis, *J Mater Chem B* 6 (2018) 6133–6141. <https://doi.org/10.1039/C8TB01109E>.
- [22] S. Liu, K. Huang, H. Yu, F. Wu, Bioplastic based on 1,8-octanediol-plasticized feather keratin: A material for food packaging and biomedical applications, *J Appl Polym Sci* 135 (2018) 46516. <https://doi.org/10.1002/app.46516>.
- [23] A.J. Poole, J.S. Church, The effects of physical and chemical treatments on Na₂S produced feather keratin films, *Int J Biol Macromol* 73 (2015) 99–108. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.11.003>.
- [24] R.K. Donato, A. Mija, Keratin Associations with Synthetic, Biosynthetic and Natural Polymers: An Extensive Review, *Polymers (Basel)* 12 (2019) 32. <https://doi.org/10.3390/polym12010032>.
- [25] D. Wang, R.C. Tang, Dissolution of wool in the choline chloride/oxalic acid deep eutectic solvent, *Mater Lett* 231 (2018) 217–220. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2018.08.056>.

- [26] W. Du, L. Zhang, C. Zhang, J. Cao, D. Wang, H. Li, W. Li, J. Zeng, Green and Highly Efficient Wool Keratin Extraction by Microwave Induction Method, *Front Mater* 8 (2022) 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmats.2021.789081>.
- [27] C.R. Holkar, S.S. Jain, A.J. Jadhav, D. V. Pinjari, Valorization of keratin based waste, *Process Safety and Environmental Protection* 115 (2018) 85–98. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2017.08.045>.
- [28] X. Wang, Z. Shi, Q. Zhao, Y. Yun, Study on the Structure and Properties of Biofunctional Keratin from Rabbit Hair, *Materials* 14 (2021) 379. <https://doi.org/10.3390/ma14020379>.
- [29] H. Rajabinejad, M. Zoccola, A. Patrucco, A. Montarsolo, G. Rovero, C. Tonin, Physicochemical properties of keratin extracted from wool by various methods, *Textile Research Journal* 88 (2017) 2415–2424. <https://doi.org/10.1177/0040517517723028>.
- [30] S.I.N. Ayutthaya, S. Tanpichai, J. Wootthikanokkhan, Keratin Extracted from Chicken Feather Waste: Extraction, Preparation, and Structural Characterization of the Keratin and Keratin/Biopolymer Films and Electrospuns, *J Polym Environ* 23 (2015) 506–516. <https://doi.org/10.1007/s10924-015-0725-8>.
- [31] M. Khumalo, sodium dodecyl sulphate and urea Sithole, Bruceon of keratin extraction from waste chicken feathers by sodium bisulphite, T. Tesfaye, Valorisation of waste chicken feathers: Optimisation of keratin extraction from waste chicken feathers by sodium bisulphite, sodium dodecyl sulphate and urea, *J Environ Manage* 262 (2020) 110329. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110329>.
- [32] I. Sinkiewicz, A. Śliwińska, H. Staroszczyk, I. Kołodziejska, Alternative methods of preparation of soluble keratin from chicken feathers, *Waste Biomass Valorization* 8 (2017) 1043–1048. <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9678-y>.
- [33] A.M.J. Crowell, M.J. Wall, A.A. Doucette, Maximizing recovery of water-soluble proteins through acetone precipitation, *Anal Chim Acta* 796 (2013) 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.08.005>.

- [34] V. Baghalabadi, A.A. Doucette, Mass spectrometry profiling of low molecular weight proteins and peptides isolated by acetone precipitation, *Anal Chim Acta* 1138 (2020) 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.08.057>.
- [35] J.R. Barone, W.F. Schmidt, C.F.E. Liebner, Thermally processed keratin films, *J Appl Polym Sci* 97 (2005) 1644–1651. <https://doi.org/10.1002/app.21901>.
- [36] A. Ghosh, S. Clerens, S. Deb-Choudhury, J.M. Dyer, Thermal effects of ionic liquid dissolution on the structures and properties of regenerated wool keratin, *Polym Degrad Stab* 108 (2014) 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2014.06.007>.
- [37] R.A. Gross, B. Kalra, Biodegradable polymers for the environment, *Science* (1979) 297 (2002) 803–807. <https://doi.org/10.1126/science.297.5582.803>.
- [38] C.G. Otoni, B.D. Lodi, M. V. Lorevice, R.C. Leitão, M.D. Ferreira, M.R. de Moura, L.H.C. Mattoso, Optimized and scaled-up production of cellulose-reinforced biodegradable composite films made up of carrot processing waste, *Ind Crops Prod* 121 (2018) 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.003>.
- [39] J.F. Mendes, J.T. Martins, A. Manrich, A.R. Sena Neto, A.C.M. Pinheiro, L.H.C. Mattoso, M.A. Martins, Development and physical-chemical properties of pectin film reinforced with spent coffee grounds by continuous casting, *Carbohydr Polym* 210 (2019) 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.01.058>.
- [40] O. Adekomaya, T. Majozi, Sustainable management of plastic waste: Assessment of recycled biodegradable plastic market and projection for the future, *Engineering and Applied Science Research* 47 (2020) 216–221. <https://doi.org/10.14456/easr.2020.24>.
- [41] A. Samir, F.H. Ashour, A.A.A. Hakim, M. Bassyouni, Recent advances in biodegradable polymers for sustainable applications, *Npj Mater Degrad* 6 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41529-022-00277-7>.
- [42] Y. Zhong, P. Godwin, Y. Jin, H. Xiao, Biodegradable polymers and green-based antimicrobial packaging materials: A mini-review, *Advanced*

- Industrial and Engineering Polymer Research 3 (2020) 27–35.
<https://doi.org/10.1016/j.aiepr.2019.11.002>.
- [43] O.M. Elshayb, A.M. Nada, K.Y. Farroh, A.A. Al-Huqail, M. Aljabri, N. Binothman, M.F. Seleiman, Utilizing Urea–Chitosan Nanohybrid for Minimizing Synthetic Urea Application and Maximizing *Oryza sativa* L. Productivity and N Uptake, *Agriculture (Switzerland)* 12 (2022).
<https://doi.org/10.3390/agriculture12070944>.
- [44] F.K.V. Moreira, J.M. Marconcini, L.H.C. Mattoso, Analysis of the influence of composition and processing parameters on the mechanical properties of biodegradable starch/pectin blends, *Polymer Bulletin* 69 (2012) 561–577.
<https://doi.org/10.1007/s00289-012-0750-x>.
- [45] O.M. Oluba, C.F. Obi, O.B. Akpor, S.I. Ojeaburu, F.D. Ogunrotimi, A.A. Adediran, M. Oki, Fabrication and characterization of keratin starch biocomposite film from chicken feather waste and ginger starch, *Sci Rep* 11 (2021) 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88002-3>.
- [46] D.L. Nelson, M.M. Cox, *Lehninger principles of biochemistry*, 7th ed., W. H. Freeman, New York, 2017.
- [47] V.W. Rodwell, D.A. Bender, K.M. Botham, P.J. Kennelly, P.A. Weil, *Harper's illustrated biochemistry*, 31st ed., McGraw-Hill Education, 2018.
- [48] D.R. Ferrier, *Biochemistry*, 7th ed., Wolters Kluwer, Philadelphia, 2017.
- [49] T.W.G. Solomons, C.B. Fryhle, S.A. Snyder, *Organic chemistry*, 12th ed., Wiley, 2016.
- [50] R.D.B. Fraser, D.A.D. Parry, Molecular packing in the feather keratin filament, *J Struct Biol* 162 (2008) 1–13.
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2008.01.011>.
- [51] A.A. Vicente, M.A. Cerqueira, L. Hilliou, C.M.R. Rocha, Protein-based resins for food packaging, in: J.-M. Lagarón (Ed.), *Multifunctional and Nanoreinforced Polymers for Food Packaging*, Woodhead Publishing, Cambridge, 2011: pp. 610–648.
<https://doi.org/10.1533/9780857092786.4.610>.
- [52] J.M. Cardamone, Investigating the microstructure of keratin extracted from wool: Peptide sequence (MALDI-TOF/TOF) and protein conformation

- (FTIR), *J Mol Struct* 969 (2010) 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2010.01.048>.
- [53] E. Goormaghtigh, V. Cabiaux, J.M. Ruyschaert, Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy, in: H.J. Hilderson, G.B. Ralston (Eds.), *Physicochemical Methods in the Study of Biomembranes. Subcellular Biochemistry*, Springer, Boston, MA, 1994: pp. 405–450. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1863-1_10.
- [54] J.T. Pelton, L.R. McLean, Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure, *Anal Biochem* 277 (2000) 167–176. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4320>.
- [55] L. Alibardi, L. Dalla Valle, V. Toffolo, M. Toni, Scale keratin in lizard epidermis reveals amino acid regions homologous with avian and mammalian epidermal proteins, *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 288A (2006) 734–752. <https://doi.org/10.1002/ar.a.20342>.
- [56] B. Wang, W. Yang, J. McKittrick, M.A. Meyers, Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration, *Prog Mater Sci* 76 (2016) 229–318. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2015.06.001>.
- [57] J.R. McKee, T. McKee, *Biochemistry: The molecular basis of life*, 7th ed., Oxford University Press, New York, 2019.
- [58] H. Lodish, A. Berk, C.A. Kaiser, M. Krieger, A. Bretscher, H. Ploegh, A. Amon, K.C. Martin, *Molecular Cell Biology*, 8th ed., W. H. Freeman, New York, 2016.
- [59] A.M. Hyde, S.L. Zultanski, J.H. Waldman, Y.L. Zhong, M. Shevlin, F. Peng, General Principles and Strategies for Salting-Out Informed by the Hofmeister Series, *Org Process Res Dev* 21 (2017) 1355–1370. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.7b00197>.
- [60] N.E. De Jesús-González, A. Pérez De La Luz, J. López-Lemus, J. Alejandro, Effect of the Dielectric Constant on the Solubility of Acetone in Water, *J Chem Eng Data* 63 (2018) 1170–1179. <https://doi.org/10.1021/acs.jced.7b00573>.

- [61] B. Ma, X. Qiao, X. Hou, Y. Yang, Pure keratin membrane and fibers from chicken feather, *Int J Biol Macromol* 89 (2016) 614–621. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.039>.
- [62] Y. Dou, B. Zhang, M. He, G. Yin, Y. Cui, The structure, tensile properties and water resistance of hydrolyzed feather keratin-based bioplastics, *Chin J Chem Eng* 24 (2015) 415–420. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2015.11.007>.
- [63] Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Projeções do Agronegócio: Brasil 2019/20 a 2029/2030, Brasília, 2020.
- [64] Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Indicadores IBGE: Estatística da produção pecuária, Rio de Janeiro, 2012.
- [65] Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Indicadores IBGE: Estatística da produção pecuária, Rio de Janeiro, 2021.
- [66] E.M. Nuutinen, P. Willberg-Keyriläinen, T. Virtanen, A. Mija, L. Kuutti, R. Lantto, A.S. Jääskeläinen, Green process to regenerate keratin from feathers with an aqueous deep eutectic solvent, *RSC Adv* 9 (2019) 19720–19728. <https://doi.org/10.1039/c9ra03305j>.
- [67] I. Campos, L.M. Pinheiro Valente, E. Matos, P. Marques, F. Freire, Life-cycle assessment of animal feed ingredients: Poultry fat, poultry by-product meal and hydrolyzed feather meal, *J Clean Prod* 252 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119845>.
- [68] I. Sinkiewicz, H. Staroszczyk, A. Śliwińska, Solubilization of keratins and functional properties of their isolates and hydrolysates, *J Food Biochem* 42 (2018) e12494. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12494>.
- [69] M.N. de Arruda, Extração, caracterização e modificação química da queratina extraída das penas de frango, Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, 2010. <https://doi.org/10.11606/D.9.2013.tde-11092013-150522>.
- [70] J.M. Kim, Y.M. Choi, H.J. Suh, Preparation of Feather Digests as Fertilizer with *Bacillus pumilis* KHS-1, *J Microbiol Biotechnol* 15 (2005) 472–476.
- [71] C. Gaidau, M. Stanca, M.D. Niculescu, C.A. Alexe, M. Becheritu, R. Horoias, C. Cioineag, M. Râpă, I.R. Stanculescu, Wool keratin

- hydrolysates for bioactive additives preparation, *Materials* 14 (2021) 1–16. <https://doi.org/10.3390/ma14164696>.
- [72] G.T. Gindaba, S.G. Filate, B.B. Etana, Extraction and Characterization of Natural Protein (Keratin) From Waste Chicken Feather, *International Journal of Modern Science and Technology* 4 (2019) 174–179.
- [73] F. Pourjavaheeri, F. Mohaddes, P. Bramwell, F. Sherkat, R.A. Shanks, Purification of avian biological material to refined keratin fibres, *RSC Adv* 5 (2015) 69899–69906. <https://doi.org/10.1039/c5ra08947f>.
- [74] T. Lingham-Soliar, R.H.C. Bonser, J. Wesley-Smith, Selective biodegradation of keratin matrix in feather rachis reveals classic bioengineering, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 277 (2010) 1161–1168. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.1980>.
- [75] M. Yu, Z. Yue, P. Wu, D.Y. Wu, J.A. Mayer, M. Medina, R.B. Widelitz, T.X. Jiang, C.M. Chuong, The developmental biology of feather follicles, *International Journal of Developmental Biology* 48 (2004) 181–191. <https://doi.org/10.1387/ijdb.15272383>.
- [76] J. McKittrick, P.Y. Chen, S.G. Bodde, W. Yang, E.E. Novitskaya, M.A. Meyers, The structure, functions, and mechanical properties of keratin, *JOM* 64 (2012) 449–468. <https://doi.org/10.1007/s11837-012-0302-8>.
- [77] J.R. Baron, *Procedurally Generating Biologically Driven Bird and Non-Avian Dinosaur Feathers*, Clemson University, 2018.
- [78] E. Nuutinen, *Feather Characterization and Processing*, Aalto University, 2017.
- [79] B.S. Harrap, E.F. Woods, Soluble derivatives of feather keratin. 1. Isolation, fractionation and amino acid composition, *Biochem J* 92 (1964) 8–18. <https://doi.org/10.1042/bj0920008>.
- [80] C. Tonin, M. Zoccola, A. Aluigi, A. Varesano, A. Montarsolo, C. Vineis, F. Zimbardi, Study on the conversion of wool keratin by steam explosion, *Biomacromolecules* 7 (2006) 3499–3504. <https://doi.org/10.1021/bm060597w>.
- [81] Y. Lai, X. Wu, X. zheng, W. Li, L. Wang, Insights into the keratin efficient degradation mechanism mediated by *Bacillus* sp. CN2 based on integrating

- functional degradomics, *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts* 16 (2023) 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13068-023-02308-0>.
- [82] Y. Liu, X. Chen, J.H. Xin, Hydrophobic duck feathers and their simulation on textile substrates for water repellent treatment, *Bioinspir Biomim* 3 (2008). <https://doi.org/10.1088/1748-3182/3/4/046007>.
- [83] C.M. Eliason, M.D. Shawkey, Decreased hydrophobicity of iridescent feathers: A potential cost of shiny plumage, *Journal of Experimental Biology* 214 (2011) 2157–2163. <https://doi.org/10.1242/jeb.055822>.
- [84] P. Sun, Z.T. Liu, Z.W. Liu, Particles from bird feather: A novel application of an ionic liquid and waste resource, *J Hazard Mater* 170 (2009) 786–790. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2009.05.034>.
- [85] T. Lingham-Soliar, Microstructural tissue-engineering in the rachis and barbs of bird feathers, *Sci Rep* 7 (2017) 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep45162>.
- [86] T. Lingham-Soliar, Microstructural tissue-engineering in the rachis and barbs of bird feathers, *Sci Rep* 7 (2017) 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep45162>.
- [87] A. Ghosh, S.R. Collie, Keratinous materials as novel absorbent systems for toxic pollutants, *Def Sci J* 64 (2014) 209–221. <https://doi.org/10.14429/dsj.64.7319>.
- [88] S. Sharma, A. Kumar, *Keratin as a Protein Biopolymer*, 1st ed., Springer International Publishing, Cham, 2019. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-02901-2>.
- [89] R.C. Marshall, Nail, Claw, Hoof and Horn Keratin, in: *Biology of the Integument*, Springer Berlin Heidelberg, 1986: pp. 722–738. https://doi.org/10.1007/978-3-662-00989-5_35.
- [90] B.S. Lazarus, C. Chadha, A. Velasco-Hogan, J.D.V. Barbosa, I. Jasiuk, M.A. Meyers, Engineering with keratin: A functional material and a source of bioinspiration, *IScience* 24 (2021) 102798. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102798>.

- [91] X. Jin, Y. Wang, J. Yuan, J. Shen, Extraction, characterization, and NO release potential of keratin from human hair, *Mater Lett* 175 (2016) 188–190. <https://doi.org/10.1016/J.MATLET.2016.04.036>.
- [92] P.M.M. Schrooyen, P.J. Dijkstra, R.C. Oberthür, A. Bantjes, J. Feijen, Partially Carboxymethylated Feather Keratins. 1. Properties in Aqueous Systems, *J Agric Food Chem* 48 (2000) 4326–4334. <https://doi.org/10.1021/jf9913155>.
- [93] T. Fujii, D. Li, Preparation and properties of protein films and particles from chicken feather, *Int J Biol Macromol* 8 (2008) 48–55.
- [94] C.B. Anfinsen, E. Haber, Studies on the reduction and re-formation of protein disulfide bonds., *J Biol Chem* 236 (1961) 1361–1363. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)64177-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)64177-8).
- [95] K. Yamauchi, A. Yamauchi, T. Kusunoki, A. Kohda, Y. Konishi, Preparation of stable aqueous solution of keratins, and physiochemical and biodegradational properties of films, *J Biomed Mater Res* 31 (1996) 439–444. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199608\)31:4<439::AID-JBM1>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199608)31:4<439::AID-JBM1>3.0.CO;2-M).
- [96] Q.Q. Wang, L. Zhang, Q.Q. Wang, J. Liu, P. Zhu, Z.N. Jiang, Sodium sulphide extraction of human keratin, *Ferroelectrics* 529 (2018) 105–112. <https://doi.org/10.1080/00150193.2018.1458507>.
- [97] A.J. Poole, R.E. Lyons, J.S. Church, Dissolving Feather Keratin Using Sodium Sulfide for Bio-Polymer Applications, *J Polym Environ* 19 (2011) 995–1004. <https://doi.org/10.1007/s10924-011-0365-6>.
- [98] E.M. Brown, K. Pandya, M.M. Taylor, C.-K. Liu, Comparison of Methods for Extraction of Keratin from Waste Wool, *Agricultural Sciences* 07 (2016) 670–679. <https://doi.org/10.4236/as.2016.710063>.
- [99] K. Wang, R. Li, J.H. Ma, Y.K. Jian, J.N. Che, Extracting keratin from wool by using L-cysteine, *Green Chemistry* 18 (2016) 476–481. <https://doi.org/10.1039/c5gc01254f>.
- [100] P.M.M. Schrooyen, P.J. Dijkstra, R.C. Oberthür, A. Bantjes, J. Feijen, Stabilization of solutions of feather keratins by sodium dodecyl sulfate, *J*

- Colloid Interface Sci 240 (2001) 30–39.
<https://doi.org/10.1006/jcis.2001.7673>.
- [101] A. Kuzuhara, Analysis of structural change in keratin fibers resulting from chemical treatments using Raman spectroscopy, *Biopolymers* 77 (2005) 335–344. <https://doi.org/10.1002/bip.20221>.
- [102] S.M. Martelli, G.R.P. Moore, J.B. Laurindo, Mechanical properties, water vapor permeability and water affinity of feather keratin films plasticized with sorbitol, *J Polym Environ* 14 (2006) 215–222. <https://doi.org/10.1007/s10924-006-0017-4>.
- [103] G.J. Weston, The infra-red spectrum of peracetic acid-treated wool, *Biochim Biophys Acta* 17 (1955) 462–464.
- [104] S. Saha, M. Arshad, M. Zubair, A. Ullah, Keratin as a Biopolymer, in: *Keratin as a Protein Biopolymer*, 1st ed., Springer Series on Polymer and Composite Materials. Springer, Cham, 2019: pp. 163–185. https://doi.org/10.1007/978-3-030-02901-2_6.
- [105] D. Garrido Ruiz, A. Sandoval-Perez, A.V. Rangarajan, E.L. Gunderson, M.P. Jacobson, Cysteine Oxidation in Proteins: Structure, Biophysics, and Simulation, *Biochemistry* 61 (2022) 2165–2176. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.2c00349>.
- [106] A. Strasheim, K. Buijs, An infra-red study of the oxidation of the disulphide bond in wool, *Biochim Biophys Acta* 47 (1961) 538–541.
- [107] B. Fernández-d’Arlas, Tough and Functional Cross-linked Bioplastics from Sheep Wool Keratin, *Sci Rep* 9 (2019) 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51393-5>.
- [108] E. Jortzik, L. Wang, K. Becker, Thiol-based posttranslational modifications in parasites, *Antioxid Redox Signal* 17 (2012) 657–673. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4266>.
- [109] V.C. MacArel, C.D. Radu, L. Verestiuc, F.D. Ivan, E. Ulea, F. Lipsa, M.A. Florea, I.E. Muresan, C. Tamas, C. Piroi, C. Munteanu, Researches concerning chemical modifications of hair keratin, *Revista de Chimie* 70 (2019) 2091–2095. <https://doi.org/10.37358/rc.19.6.7281>.

- [110] S. Akter, L. Fu, Y. Jung, M. Lo Conte, J. Reed Lawson, W. Todd Lowther, R. Sun, K. Liu, J. Yang, K.S. Carroll, Chemical proteomics reveals new targets of cysteine sulfinic acid reductase, *Nat Chem Biol* 14 (2018) 995–1004. <https://doi.org/10.1038/s41589-018-0116-2>.
- [111] M. Rajabi, A. Ali, M. McConnell, J. Cabral, Keratinous materials: Structures and functions in biomedical applications, *Materials Science and Engineering C* 110 (2020) 110612. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110612>.
- [112] C. Earland, C.S. Knight, Studies on the structure of keratin. I. The analysis of fractions isolated from wool oxidized with peracetic acid, *BBA - Biochimica et Biophysica Acta* 17 (1955) 457–461. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(55\)90406-6](https://doi.org/10.1016/0006-3002(55)90406-6).
- [113] J.H. Buchanan, A cystine-rich protein fraction from oxidized α -keratin, *Biochemical Journal* 167 (1977) 489–491. <https://doi.org/10.1042/bj1670489>.
- [114] P. Sierpinski, J. Garrett, J. Ma, P. Apel, D. Klorig, T. Smith, L.A. Koman, A. Atala, M. Van Dyke, The use of keratin biomaterials derived from human hair for the promotion of rapid regeneration of peripheral nerves, *Biomaterials* 29 (2008) 118–128. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.08.023>.
- [115] A. Shavandi, A. Carne, A.A. Bekhit, A.E.D.A. Bekhit, An improved method for solubilisation of wool keratin using peracetic acid, *J Environ Chem Eng* 5 (2017) 1977–1984. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.03.043>.
- [116] N. Kissi, K. Curran, C. Vlachou-Mogire, T. Fearn, L. McCullough, Developing a non-invasive tool to assess the impact of oxidation on the structural integrity of historic wool in Tudor tapestries, *Herit Sci* 5 (2017) 1–14. <https://doi.org/10.1186/s40494-017-0162-1>.
- [117] A. Aluigi, C. Vineis, A. Varesano, G. Mazzuchetti, F. Ferrero, C. Tonin, Structure and properties of keratin/PEO blend nanofibres, *Eur Polym J* 44 (2008) 2465–2475. <https://doi.org/10.1016/J.EURPOLYMJ.2008.06.004>.

- [118] K. Katoh, T. Tanabe, K. Yamauchi, Novel approach to fabricate keratin sponge scaffolds with controlled pore size and porosity, *Biomaterials* 25 (2004) 4255–4262. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.11.018>.
- [119] Y. Nagai, T. Nishikawa, Alkali solubilization of chicken feather keratin, *Agric Biol Chem* 34 (1970) 16–22. <https://doi.org/10.1271/bbb1961.34.16>.
- [120] M.D. Berechet, C. Gaidău, M.D. Niculescu, M. Stanca, The influence of alkaline hydrolysis of wool by-products on the characteristics of keratin hydrolysates, in: 7th International Conference on Advanced Materials and Systems, Inst. Nat. Cercetare-Dezvoltare Text. Pielarie, 2018: pp. 39–44. <https://doi.org/10.24264/ICAMS-2018.I.4>.
- [121] S. Perța-Crișan, C. Ștefan Ursachi, S. Gavrițaș, F. Oancea, F.D. Munteanu, Closing the loop with keratin-rich fibrous materials, *Polymers (Basel)* 13 (2021). <https://doi.org/10.3390/polym13111896>.
- [122] C. Gaidau, D.G. Epure, C.E. Enascuta, C. Carsote, C. Sendrea, N. Proietti, W. Chen, H. Gu, Wool keratin total solubilisation for recovery and reintegration - An ecological approach, *J Clean Prod* 236 (2019) 117586. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.07.061>.
- [123] A. Shavandi, A.E.D.A. Bekhit, A. Carne, A. Bekhit, Evaluation of keratin extraction from wool by chemical methods for bio-polymer application, *J Bioact Compat Polym* 32 (2017) 163–177. <https://doi.org/10.1177/0883911516662069>.
- [124] H. Xie, S. Li, S. Zhang, Ionic liquids as novel solvents for the dissolution and blending of wool keratin fibers, *Green Chemistry* 7 (2005) 606–608. <https://doi.org/10.1039/b502547h>.
- [125] R. Li, D. Wang, Preparation of regenerated wool keratin films from wool keratin-ionic liquid solutions, *J Appl Polym Sci* 127 (2013) 2648–2653. <https://doi.org/10.1002/app.37527>.
- [126] Z. Jiang, J. Yuan, P. Wang, X. Fan, J. Xu, Q. Wang, L. Zhang, Dissolution and regeneration of wool keratin in the deep eutectic solvent of choline chloride-urea, *Int J Biol Macromol* 119 (2018) 423–430. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.161>.

- [127] M. Zoccola, A. Aluigi, A. Patrucco, C. Vineis, F. Forlini, P. Locatelli, M.C. Sacchi, C. Tonin, Microwave-assisted chemical-free hydrolysis of wool keratin, *Textile Research Journal* 82 (2012) 2006–2018. <https://doi.org/10.1177/0040517512452948>.
- [128] P. Vanaki, F. Zaboli, H. Kaboosi, R.I. Amoli, F. Savadkoohi, Isolation and identification of keratinolytic probiotic *Bucillus licheniformis* bacteria from the soil below poultry slaughterhouse waste, *Brazilian Journal of Biology* 84 (2024) 1–15. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.257473>.
- [129] N. Eslahi, F. Dadashian, N.H. Nejad, An investigation on keratin extraction from wool and feather waste by enzymatic hydrolysis, *Prep Biochem Biotechnol* 43 (2013) 624–648. <https://doi.org/10.1080/10826068.2013.763826>.
- [130] C. Su, J.S. Gong, J.P. Ye, J.M. He, R.Y. Li, M. Jiang, Y. Geng, Y. Zhang, J.H. Chen, Z.H. Xu, J.S. Shi, Enzymatic Extraction of Bioactive and Self-Assembling Wool Keratin for Biomedical Applications, *Macromol Biosci* 20 (2020) 1–11. <https://doi.org/10.1002/mabi.202000073>.
- [131] N. Zhang, Q. Wang, J. Yuan, L. Cui, P. Wang, Y. Yu, X. Fan, Highly efficient and eco-friendly wool degradation by L-cysteine-assisted esperase, *J Clean Prod* 192 (2018) 433–442. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.05.008>.
- [132] G.R.P. Moore, S.M. Martelli, C. Gandolfo, P.J. do A. Sobral, J.B. Laurindo, Influence of the glycerol concentration on some physical properties of feather keratin films, *Food Hydrocoll* 20 (2006) 975–982. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.11.001>.
- [133] H. Xu, Z. Ma, Y. Yang, Dissolution and regeneration of wool via controlled disintegration and disentanglement of highly crosslinked keratin, *J Mater Sci* 49 (2014) 7513–7521. <https://doi.org/10.1007/s10853-014-8457-z>.
- [134] S.V. Canevarolo Jr., *Ciência dos Polímeros - Um texto básico para tecnólogos e engenheiros*, 3rd ed., Artliber, 2010.
- [135] J. William D. Callister, D.G. Rethiwsch, *Materials Science and Engineering: An introduction*, 9th ed., John Wiley & Sons, 2013.

- [136] D.O.S. Ramirez, R.A. Carletto, C. Tonetti, F.T. Giachet, A. Varesano, C. Vineis, Wool keratin film plasticized by citric acid for food packaging, *Food Packag Shelf Life* 12 (2017) 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2017.04.004>.
- [137] O.M. Oluba, E. Osayame, A.O. Shoyombo, Production and characterization of keratin-starch bio-composite film from chicken feather waste and turmeric starch, *Biocatal Agric Biotechnol* 33 (2021) 101996. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.101996>.
- [138] Z. Pedram Rad, H. Tavanai, A.R. Moradi, Production of feather keratin nanopowder through electrospraying, *J Aerosol Sci* 51 (2012) 49–56. <https://doi.org/10.1016/J.JAEROSCI.2012.04.007>.
- [139] K. Kato, M. Shibayama, T. Tanabe, K. Yamauchi, Preparation and Physicochemical Properties of Compression-molded Keratin Films, *Biomaterials* 25 (2004) 2265–2272. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2003.09.021>.
- [140] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature Publishing Group* 227 (1970) 680–685.
- [141] T.A. Bickle, R.R. Traut, Determination of ribosomal protein molecular weight distributions from stained dodecyl sulfate gels, *Methods Enzymol* 30 (1974) 545–553.
- [142] J. Cao, C.A. Billows, Crystallinity determination of native and stretched wool by X-ray diffraction, *Polym Int* 48 (1999) 1027–1033.
- [143] J. Fan, W. dong Yu, High yield preparation of keratin powder from wool fiber, *Fibers and Polymers* 2012 13:8 13 (2012) 1044–1049. <https://doi.org/10.1007/S12221-012-1044-5>.
- [144] L.A. Forato, R. Bernardes Filho, L.A. Colnago, Estudo de métodos de aumento de resolução de espectros de FTIR para análise de estruturas secundárias de proteínas, *Quim Nova* 21 (1998) 146–150. <https://doi.org/10.1590/S0100-40421998000200008>.
- [145] J.Y. Lai, S.J. Lue, H.Y. Cheng, D.H.K. Ma, Effect of matrix nanostructure on the functionality of carbodiimide cross-linked amniotic membranes as

- limbal epithelial cell scaffolds, *J Biomed Nanotechnol* 9 (2013) 2048–2062.
<https://doi.org/10.1166/jbn.2013.1734>.
- [146] A. Barth, C. Zscherp, What vibrations tell us about proteins, *Q Rev Biophys* 35 (2002) 369–430. <https://doi.org/10.1017/S0033583502003815>.
- [147] ASTM standard D882, 2010, Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2010.
<https://doi.org/10.1520/D0882-10>.
- [148] International Organization for Standardization, ISO 14040:2006 - Environmental management — Life cycle assessment — Principles and framework, Geneva, 2006.
- [149] D.W. Roberts, D. Basketter, I. Kimber, J. White, J. McFadden, I.R. White, Sodium metabisulfite as a contact allergen - An example of a rare chemical mechanism for protein modification, *Contact Dermatitis* 66 (2012) 123–127.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.2011.02038.x>.
- [150] K. Kato, M. Shibayama, T. Tanabe, K. Yamauchi, Preparation and Physicochemical Properties of Compression-molded Keratin Films, *Biomaterials* 25 (2004) 2265–2272.
<https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2003.09.021>.
- [151] Y. Hayashi, Y. Katsumoto, S. Omori, N. Kishii, A. Yasuda, Liquid structure of the urea - Water system studied by dielectric spectroscopy, *Journal of Physical Chemistry B* 111 (2007) 1076–1080.
<https://doi.org/10.1021/jp065291y>.
- [152] B. Ma, X. Qiao, X. Hou, Y. Yang, Pure keratin membrane and fibers from chicken feather, *Int J Biol Macromol* 89 (2016) 614–621.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.039>.
- [153] T. Fujii, D. Li, Preparation and properties of protein films and particles from chicken feather, *Int J Biol Macromol* 8 (2008) 48–55.
- [154] J. He, D. Xu, J. Li, L. Li, W. Li, W. Cui, K. Liu, Highly efficient extraction of large molecular-weight keratin from wool in a water/ethanol co-solvent, *Textile Research Journal* 90 (2020) 1084–1093.
<https://doi.org/10.1177/0040517519885022>.

- [155] Y. Li, Y. Li, C. Li, X. Zhang, F. Zeng, H. Lin, Z. Su, Optical and mechanical properties of NaCl: Ce³⁺ crystal grown by the Czochralski method, *Journal of Materials Science: Materials in Electronics* 31 (2020) 13070–13077. <https://doi.org/10.1007/s10854-020-03857-y>.
- [156] B. Srour, S. Bruechert, S.L.A. Andrade, P. Hellwig, Secondary structure determination by means of ATR-FTIR spectroscopy, *Methods in Molecular Biology* 1635 (2017) 195–203. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7151-0_10.
- [157] F. Mallamace, C. Corsaro, D. Mallamace, S. Vasi, C. Vasi, G. Dugo, The role of water in protein's behavior: The two dynamical crossovers studied by NMR and FTIR techniques, *Comput Struct Biotechnol J* 13 (2015) 33–37. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2014.11.007>.
- [158] S. Strnad, Z. Oberhollenzer, O. Sauperl, T. Kreze, L.F. Zemljic, Modifying properties of feather keratin bioplastic films using konjac glucomannan, *Cellulose Chemistry and Technology* 53 (2019) 1017–1027. <https://doi.org/10.35812/CelluloseChemTechnol.2019.53.100>.
- [159] F. Selmin, F. Cilurzo, A. Aluigi, S. Franzè, P. Minghetti, Regenerated keratin membrane to match the in vitro drug diffusion through human epidermis, *Results Pharma Sci* 2 (2012) 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.rinphs.2012.10.001>.
- [160] G. Yang, Y. Yao, X. Wang, Comparative study of kerateine and keratose based composite nanofibers for biomedical applications, *Materials Science and Engineering C* 83 (2018) 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.07.057>.
- [161] S. Alahyaribeik, A. Ullah, Methods of keratin extraction from poultry feathers and their effects on antioxidant activity of extracted keratin, *Int J Biol Macromol* 148 (2020) 449–456. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.144>.
- [162] H. Belkhanchi, Y. Ziat, M. Hammi, O. Ifguis, Formulation, optimization of a poultry feed and analysis of spectrometry, biochemical composition and energy facts, *S Afr J Chem Eng* 44 (2023) 31–41. <https://doi.org/10.1016/J.SAJCE.2023.01.005>.

- [163] L. Shi, L. Liu, B. Yang, G. Sheng, T. Xu, Evaluation of industrial urea energy consumption (EC) based on life cycle assessment (LCA), *Sustainability (Switzerland)* 12 (2020) 1–17. <https://doi.org/10.3390/su12093793>.
- [164] P. Kumar, S. Verma, A. Gupta, A. Ranjan Paul, A. Jain, N. Haque, Life cycle analysis for the production of urea through syngas, *IOP Conf Ser Earth Environ Sci* 795 (2021). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/795/1/012031>.
- [165] W.L. Luyben, Design and control of the acetone process via dehydrogenation of 2-propanol, *Ind Eng Chem Res* 50 (2011) 1206–1218. <https://doi.org/10.1021/ie901923a>.
- [166] N. Diala, Hydration of propylene to isopropanol, (1987).
- [167] N. Reddy, L. Chen, Y. Yang, Biothermoplastics from hydrolyzed and citric acid Crosslinked chicken feathers, *Materials Science and Engineering: C* 33 (2013) 1203–1208. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2012.12.011>.
- [168] S. Sharma, A. Gupta, A. Kumar, C.G. Kee, H. Kamyab, S.M. Saufi, An efficient conversion of waste feather keratin into ecofriendly bioplastic film, *Clean Technol Environ Policy* 20 (2018) 2157–2167. <https://doi.org/10.1007/s10098-018-1498-2>.
- [169] M. Danish, M.W. Mumtaz, M. Fakhar, U. Rashid, Response Surface Methodology: An Imperative Tool for the Optimized Purification of the Residual Glycerol from Biodiesel Production Process, *Chiang Mai Journal of Science* 44 (2017) 1570–1582.
- [170] E.L. Hanry, N.F.M. Redzwan, N.F.A.K. Badeges, N. Surugau, Characterization of biofilms developed from alginate extracted from *Padina* sp. incorporated with calcium chloride (CaCl₂), *J Phys Conf Ser* 2314 (2022). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/2314/1/012022>.
- [171] N.A. Azmi, A. Idris, N.S.M. Yusof, Ultrasonic technology for value added products from feather keratin, *Ultrason Sonochem* 47 (2018) 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.04.016>.
- [172] C. Kaili, Z.H. Ayub, K. Hirabayashi, Possible involvement of serine and glycine in the yellowing of acid hydrolyzed silk, *The Journal of Sericultural Science of Japan* 65 (1996) 109–113.

- [173] R. McMullen, J. Jachowicz, Thermal degradation of hair. I. Effect of curling irons, *J Cosmet Sci* 49 (1998) 223–244.
- [174] M. Richena, M. Silveira, C.A. Rezende, I. Joekes, Yellowing and bleaching of grey hair caused by photo and thermal degradation, *J Photochem Photobiol B* 138 (2014) 172–181. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.05.017>.
- [175] V.M. Longo, A. Da Silva Pinheiro, J.R. Sambrano, J.A.M. Agnelli, E. Longo, J.A. Varela, Towards an insight on photodamage in hair fibre by UV-light: An experimental and theoretical study, *Int J Cosmet Sci* 35 (2013) 539–545. <https://doi.org/10.1111/ics.12054>.
- [176] C. Hazra, T. Samanta, V. Mahalingam, A resonance energy transfer approach for the selective detection of aromatic amino acids, *J Mater Chem C Mater* 2 (2014) 10157–10163. <https://doi.org/10.1039/c4tc01954g>.
- [177] S. Kwon, A. Orsuwan, N. Bumbudsanpharoke, C. Yoon, J. Choi, S. Ko, A Short Review of Light Barrier Materials for Food and Beverage Packaging, *Korean Journal of Packaging Science and Technology* 24 (2018) 141–148. <https://doi.org/10.20909/kopast.2018.24.3.141>.
- [178] K. Song, H. Xu, K. Xie, Y. Yang, Keratin-based biocomposites reinforced and cross-linked with dual-functional cellulose nanocrystals, *ACS Sustain Chem Eng* 5 (2017) 5669–5678. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b00085>.

APÊNDICE A

Apêndice A - Definições dos Termos de Trabalho

Termo	Descrição do termo
Aminoácido	Compostos orgânicos contendo grupo amina e carboxila; Blocos construtores das proteínas
Peptídeo	Cadeia curta de aminoácidos unidos por ligações peptídicas
Proteína	Macromolécula formada por sequências específicas de aminoácidos
Resíduo de aminoácido	Refere-se a um aminoácido dentro de uma sequência de aminoácidos de uma proteína
Ligação peptídica	Ligação covalente formada entre o grupo carboxila de um aminoácido e o grupo amina de outro, formando uma amida
Ligação dissulfeto	Ligação covalente forte entre dois átomos de enxofre (-S-S-), formada pela oxidação de grupos tiol (-SH) em cisteínas adjacentes em proteínas
Estrutura primária	Sequência linear de aminoácidos em uma proteína
Estrutura secundária	Arranjos locais das cadeias proteicas em estruturas ordenadas (hélices ou folhas)
Estrutura terciária	Dobramento tridimensional completo de uma proteína
Estrutura quaternária	Organização espacial resultante da interação entre subunidades de proteínas
Hélice- α	Estrutura secundária de proteínas, com cadeia polipeptídica enrolada em formato helicoidal
Folha- β	Estrutura secundária de proteínas, com cadeias polipeptídicas adjacentes dispostas em lâminas ou folhas pregueadas

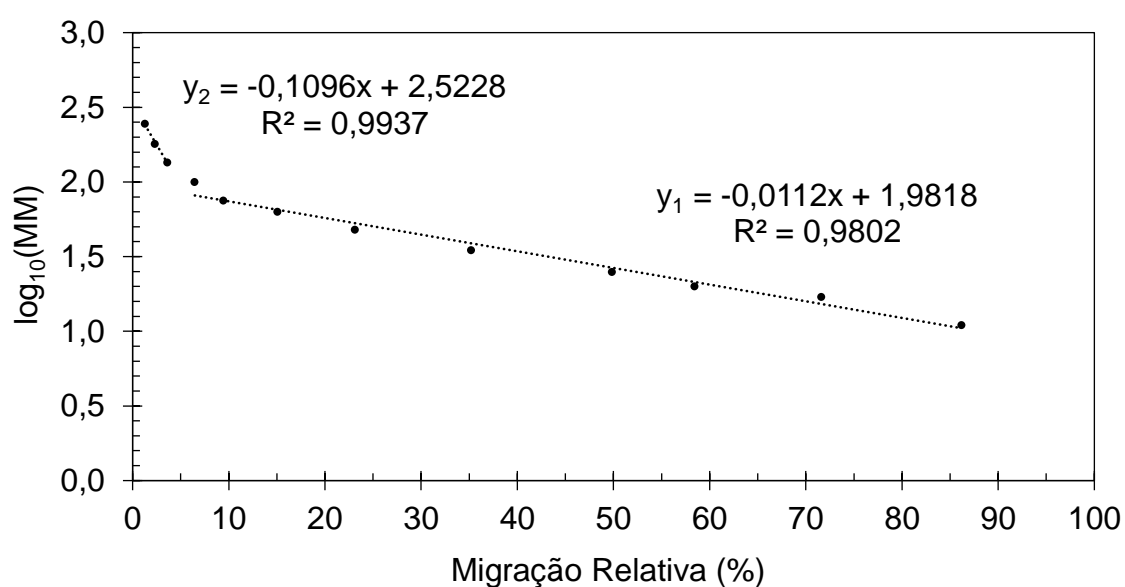
Dobra- β	Estrutura secundária de proteínas, com cadeias polipeptídicas mudando direção
Índice de Hidropatia (IP)	Parâmetro que avalia a hidrofobicidade (IP > 0) ou hidrofiliicidade (IP < 0) de um aminoácido quando pertencente a uma sequência de aminoácidos de uma proteína
Zwitterion	Uma molécula que possui grupos carregados positivamente e negativamente, porém se apresenta eletricamente neutra
<i>Salting in</i>	Processo em bioquímica onde a solubilidade de proteínas é aumentada pela adição controlada de íons (sal) a uma solução aquosa
<i>Salting out</i>	Processo em bioquímica onde a solubilidade de proteínas é reduzida ao adicionar altas concentrações de sais a uma solução aquosa
Potencial hidrogeniônico (pH)	Escala logarítmica da concentração molar de cátions hidroxônio (H^+ ou H_3O^+), indica se uma solução é ácida (pH < 7), neutra (pH = 7) ou básica (pH > 7)
Queratina	Proteína fibrosa e rica em cisteína, responsável pela formação de diversos tecidos externos de organismos (pena, pelos, unhas, chifres, etc.)
Sulfitólise	Reação química de quebra de uma ligação dissulfeto ($-S-S-$)
Polímero biodegradável	Material composto por macromoléculas que podem ser decompostas naturalmente por microrganismos em condições adequadas
Polímero termoplástico	Um material polimérico que amolece e pode ser moldado repetidamente quando aquecido e solidifica quando resfriado
Engenharia de tecido	Campo da engenharia biomédica que usa uma combinação de engenharia, materiais, células e fatores bioquímicos e físico-químicos adequados para restaurar, manter, melhorar

	ou substituir diferentes tipos de tecidos biológicos.
Hidrogel	Material capaz de reter grandes quantidades de líquido devido a sua rede tridimensional de cadeias reticuladas
<i>Scaffolds</i>	Estruturas de suporte tridimensionais, frequentemente usadas na engenharia de tecidos para guiar o crescimento celular e a regeneração de tecidos
Processo de Haber-Bosch	Processo para produção de amônia. Envolve a reação de nitrogênio atmosférico (N ₂) com hidrogênio (H ₂) obtido pela reforma a vapor do gás natural.
Reforma a vapor	Reação endotérmica entre hidrocarboneto de baixa massa molar, por exemplo metano, e água em alta temperatura
Dalton (Da)	Medida de massa molar (1 Da = 1 g/mol)
Quilodalton (kDa)	Medida de massa molar (1 kDa = 1000 g/mol)
kg PM _{2,5} eq.	Quilogramas equivalentes de partículas menores que 2,5 µm
ton oil eq.	Toneladas equivalentes de petróleo (<i>oil</i>)
ton 1,4-DCB	Toneladas equivalentes de 1,4-diclorobenzeno (1,4-DCB)
kg P eq.	Quilogramas equivalentes de fósforo (P)
ton CO ₂ eq.	Toneladas equivalentes de dióxido de carbono (CO ₂)
MBq Co-60 eq.	Megabecquerel equivalentes de Cobalto-60 (⁶⁰ Co). Bacquerel corresponde a desintegração nuclear por segundo de um material radioativo

m ² a crop eq.	m ² a de área tempo equivalente
kg N eq.	Quilogramas equivalentes de nitrogênio (N)
kg Cu eq.	Quilogramas equivalentes de cobre (Cu)
kg NO _x eq.	Quilogramas equivalentes de óxido de nitrogênio (NO _x)
kg CFC11 eq.	Quilogramas equivalentes de triclorofluormetano (CFC11). CFC-11, também conhecido por fréon, é um gás altamente inflamável e um dos responsáveis pela destruição da camada de ozônio
kg SO ₂ eq.	Quilogramas equivalentes de dióxido de enxofre (SO ₂)
10 ³ m ³	1,000,000 litros de água. Equivalente a uma piscina semiolímpica (25 x 20 x 2 m)

APÊNDICE B

Apêndice B - Equações e curvas de calibração das massas molares (MM) da análise de SDS-PAGE. Regressão linear y_1 foi utilizada para estimar a massa molar de bandas que percorreram distâncias (x) superiores ou igual a 5% da altura do gel, enquanto a regressão linear y_2 foi empregada para as bandas que percorreram até 5%.



APÊNDICE C

Apêndice C - Inventário do ciclo de vida da produção de queratina por sulfitolise e precipitação com diferentes agentes precipitantes. Os provedores foram escolhidos de países em desenvolvimento, simulando o ambiente brasileiro. Para a avaliação do ciclo de vida, todas as medidas foram proporcionais a produção de 1 tonelada de queratina.

Escaldagem do frango			
Fluxo	Quantidade	Unidade	Provedor
Entradas			
Frango para abate	714,28571	g	<i>Chicken production. Cutoff, S - GLO</i>
Água canalizada	100	g	<i>Tap water production, conventional treatment. Cutoff, S - BR</i>
Eletricidade, baixa tensão	0,00211	kWh	<i>Electricity voltage transformation from medium to low voltage. Cutoff, S - BR-South-eastern grid</i>
Saídas			
Frango escaldado	814,2857142857	g	-
Depenagem do frango			
Fluxo	Quantidade	Unidade	Provedor
Entradas			
Frango escaldado	814,28571	g	Escaldagem do frango
Eletricidade, baixa tensão	0.00165	kWh	<i>Electricity voltage transformation from medium to low voltage. Cutoff, S - BR-South-eastern grid</i>
Saídas			
Frango depenado	664,28571	g	-
Resíduo de pena de Frango	150	g	-
Limpeza e sanitização do resíduo de pena de frango			
Fluxo	Quantidade	Unidade	Provedor
Entradas			
Resíduo de pena de Frango	150	g	Depenagem do frango
Etanol, sem água, em solução 99.7%, fermentação	394,725	g	<i>Sugarcane processing, traditional annexed plant. Cutoff, S - BR</i>
Hipoclorito de sódio, sem água, em solução 15%	0,5	g	<i>Sodium hypochlorite production, product in 15% solution state. Cutoff, S - RoW</i>
Água canalizada	5480,0	g	<i>Tap water production, conventional treatment. Cutoff, S - BR</i>
Saídas			
Penas de frango, úmidas	200	g	-
Resíduo da limpeza	5825,225	g	-
Secagem da pena de frango			
Fluxo	Quantidade	Unidade	Provedor
Entradas			
Penas de frango, úmidas	200	g	Limpeza e sanitização do resíduo de pena de frango
Eletricidade, baixa tensão	4,5	kWh	<i>Electricity voltage transformation from medium to low voltage. Cutoff, S - BR-South-eastern grid</i>

Saídas			
Fluxo	Quantidade	Unidade	Provedor
Penas de frango, secas	50	g	-
Vapor d'água (Emissão)	150	g	-
Moagem da pena de frango			
Entradas			
Penas de frango, secas	50	g	Secagem da pena de frango
Eletricidade, baixa tensão	0,00613	kWh	<i>Electricity voltage transformation from medium to low voltage. Cutoff, S - BR-South-eastern grid</i>
Saídas			
Penas de frango, moídas	50	g	-
Extração de queratina por sulfitolise			
Fluxo	Quantidade	Unidade	Provedor
Entradas			
Penas de frango, moídas	50	g	Moagem da pena de frango
Bissulfito de sódio	41,6244	g	<i>Sodium hydrogen sulfite production. Cutoff, S - RoW</i>
Ureia	480,48	g	<i>Urea production. Cutoff, S - RoW</i>
Água deionizada	622,898	g	<i>Water production, deionized. Cutoff, S - RoW</i>
Eletricidade, baixa tensão	5,09666	kWh	<i>Electricity voltage transformation from medium to low voltage. Cutoff, S - BR-South-eastern grid</i>
Saídas			
Extrato de queratina	1185,0024	g	-
Resíduo da sulfitolise	10	g	-
Precipitação de queratina com HCl			
Fluxo	Quantidade	Unidade	Provedor
Entradas			
Extrato de queratina	1180,53425	g	Extração de queratina por sulfitolise
Ácido clorídrico, sem água, em solução 30%	5,83328	g	<i>Mannheim process. Cutoff, S - RoW</i>
Água deionizada	3000	g	<i>Water production, deionized. Cutoff, S - RoW</i>
Eletricidade, baixa tensão	0,34666	kWh	<i>Electricity voltage transformation from medium to low voltage. Cutoff, S - BR-South-eastern grid</i>
Saídas			
KHA, não purificada	16	g	-
Resíduo da precipitação KHA	4170,36753	g	-
Purificação da queratina KHA			
Fluxo	Quantidade	Unidade	Provedor
Entradas			
KHA, não purificada	16	g	Precipitação de queratina com HCl
Água deionizada	1800,0	g	<i>Water production, deionized. Cutoff, S - RoW</i>
Eletricidade, baixa tensão	0,17333	kWh	<i>Electricity voltage transformation from medium to low voltage. Cutoff, S - BR-South-eastern grid</i>
Saídas			
KHA, purificada	16	g	-
Resíduo da purificação KHA	1800,0	g	-
Liofilização da queratina KHA			
Fluxo	Quantidade	Unidade	Provedor
Entradas			

KHA, purificada	16	g	Purificação da queratina KHA
Eletricidade, baixa tensão	1,44	kWh	<i>Electricity voltage transformation from medium to low voltage. Cutoff, S - BR-South-eastern grid</i>
Saídas			
KHA, seca	16	g	-
Precipitação de queratina com ácido cítrico			
Fluxo	Quantidade	Unidade	Provedor
Entradas			
Extrato de queratina	1180,53425	g	Extração de queratina por sulfitólise
Ácido cítrico	33,33333	g	<i>Citric acid production. Cutoff, S - RoW</i>
Água deionizada	3000	g	<i>Water production, deionized. Cutoff, S - RoW</i>
Eletricidade, baixa tensão	0,34666	kWh	<i>Electricity voltage transformation from medium to low voltage. Cutoff, S - BR-South-eastern grid</i>
Saídas			
KCA, não purificada	17,4	g	-
Resíduo da precipitação KCA	4196,46758	g	-
Purificação da queratina KCA			
Fluxo	Quantidade	Unidade	Provedor
Entradas			
KCA, não purificada	17,4	g	Precipitação de queratina com ácido cítrico
Água deionizada	1800,0	g	<i>Water production, deionized. Cutoff, S - RoW</i>
Eletricidade, baixa tensão	0,17333	kWh	<i>Electricity voltage transformation from medium to low voltage. Cutoff, S - BR-South-eastern grid</i>
Saídas			
KCA, purificada	17,4	g	-
Resíduo da purificação KCA	1800,0	g	-
Liofilização da queratina KCA			
Fluxo	Quantidade	Unidade	Provedor
Entradas			
KCA, purificada	17,4	g	Purificação da queratina KCA
Eletricidade, baixa tensão	1,566	kWh	<i>Electricity voltage transformation from medium to low voltage. Cutoff, S - BR-South-eastern grid</i>
Saídas			
KCA, seca	17,4	g	-
Precipitação de queratina com NaCl			
Fluxo	Quantidade	Unidade	Provedor
Entradas			
Extrato de queratina	1180,53425	g	Extração de queratina por sulfitólise
Cloreto de sódio, pó	200,0	g	<i>Sodium chloride production, powder. Cutoff, S - RoW</i>
Água deionizada	3000	g	<i>Water production, deionized. Cutoff, S - RoW</i>
Eletricidade, baixa tensão	0,34666	kWh	<i>Electricity voltage transformation from medium to low voltage. Cutoff, S - BR-South-eastern grid</i>
Saídas			
KSC, não purificada	13,85	g	-
Resíduo da precipitação KSC	4366,68425	g	-
Purificação da queratina KSC			
Fluxo	Quantidade	Unidade	Provedor
Entradas			

KSC, não purificada	13,85	g	Precipitação de queratina com NaCl
Água deionizada	1800,0	g	<i>Water production, deionized. Cutoff, S - RoW</i>
Eletricidade, baixa tensão	0,17333	kWh	<i>Electricity voltage transformation from medium to low voltage. Cutoff, S - BR-South-eastern grid</i>

Saídas

KSC, purificada	13,85	g	-
Resíduo da purificação KSC	1800,0	g	-

Liofilização da queratina KSC

Fluxo	Quantidade	Unidade	Provedor
Entradas			
KSC, purificada	13,85	g	Purificação da queratina KSC
Eletricidade, baixa tensão	1,2465	kWh	<i>Electricity voltage transformation from medium to low voltage. Cutoff, S - BR-South-eastern grid</i>

Saídas

KSC, seca	13,85	g	-
-----------	-------	---	---

Precipitação de queratina com acetona (x = Recuperação de acetona)

Fluxo	Quantidade	Unidade	Provedor
Entradas			
Extrato de queratina	1180,53425	g	Extração de queratina por sulfitolise
Acetona, líquida	2352 (1 - x)	g	<i>Acetone production, from isopropanol. Cutoff, S - RoW</i>
Eletricidade, baixa tensão	0,34666	kWh	<i>Electricity voltage transformation from medium to low voltage. Cutoff, S - BR-South-eastern grid</i>

Saídas

KAT, não purificada	39,45	g	-
Resíduo da precipitação KAT	1141,08425 + 2352 (1 - x)	g	-

Purificação da queratina KAT

Fluxo	Quantidade	Unidade	Provedor
Entradas			
KAT, não purificada	39,45	g	Precipitação de queratina com acetona
Água deionizada	1800,0	g	<i>Water production, deionized. Cutoff, S - RoW</i>
Eletricidade, baixa tensão	0,17333	kWh	<i>Electricity voltage transformation from medium to low voltage. Cutoff, S - BR-South-eastern grid</i>

Saídas

KAT, purificada	39,45	g	-
Resíduo da purificação KAT	1800,0	g	-

Liofilização da queratina KAT

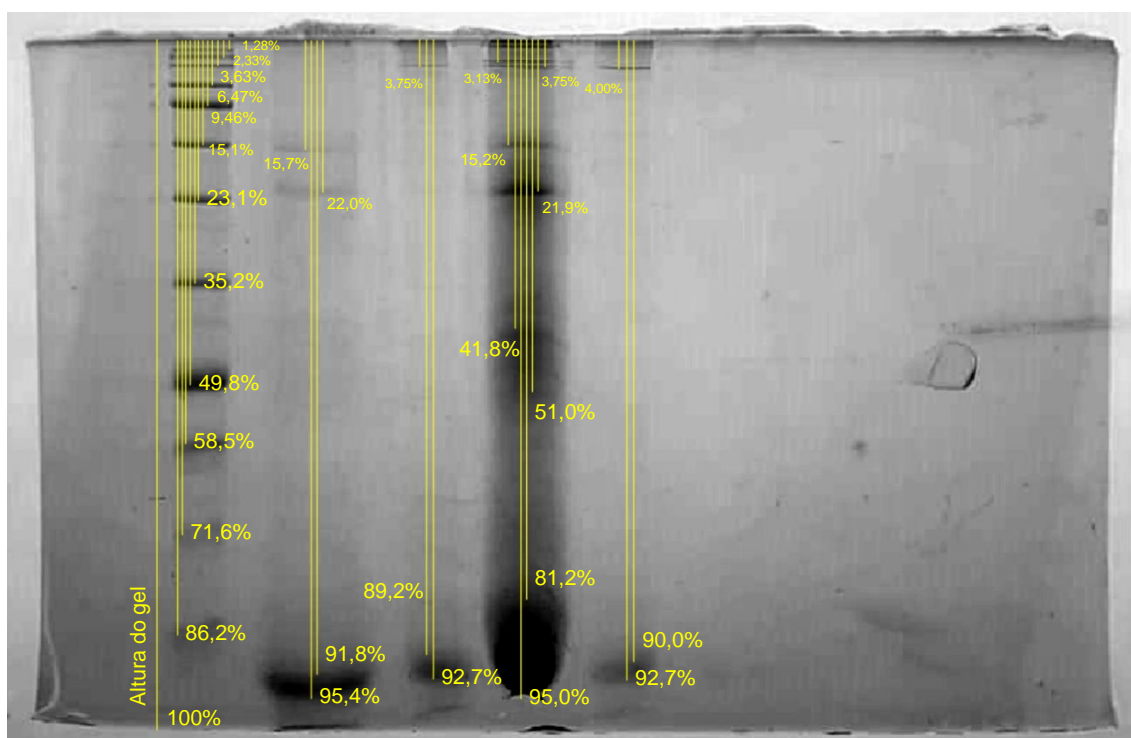
Fluxo	Quantidade	Unidade	Provedor
Entradas			
KAT, purificada	39,45	g	Purificação da queratina KAT
Eletricidade, baixa tensão	3,5505	kWh	<i>Electricity voltage transformation from medium to low voltage. Cutoff, S - BR-South-eastern grid</i>

Saídas

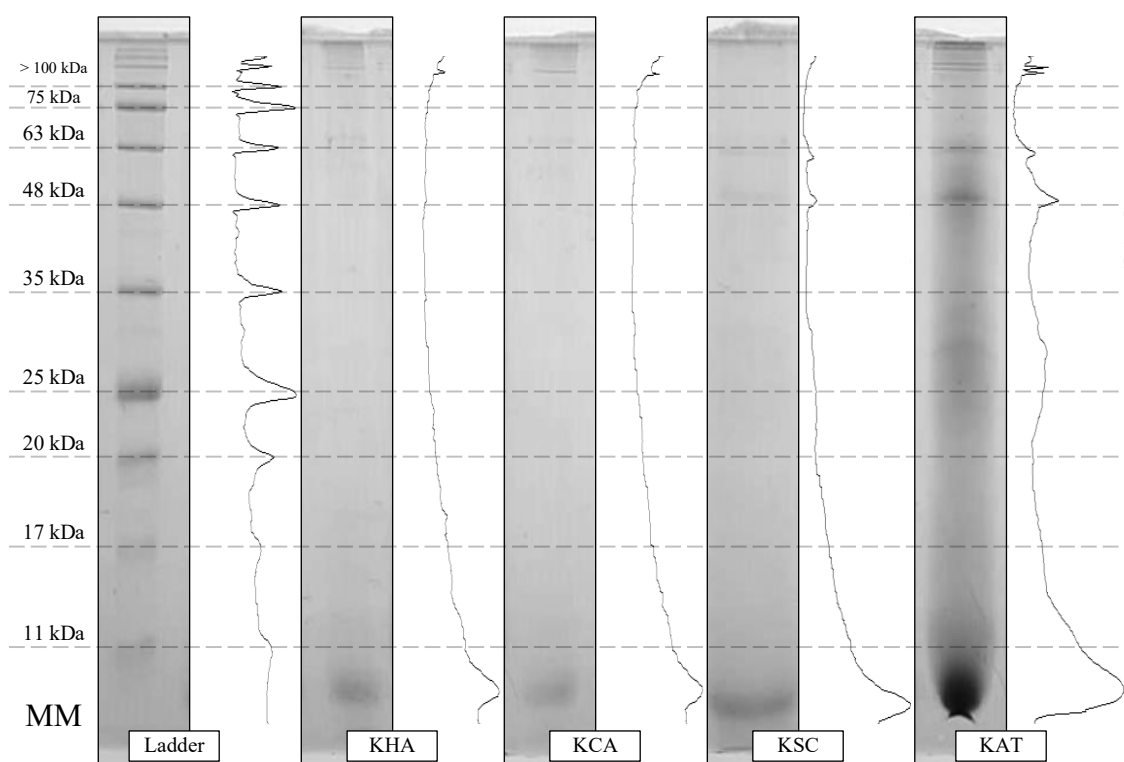
KAT, seca	39,45	g	-
-----------	-------	---	---

APÊNDICE D

Apêndice D1 - A distância de migração do SDS-PAGE. A migração, ou distância percorrida de cada banda, é relativa à altura do gel. As migrações relativas do padrão foram utilizadas para calcular a curva de calibração do Apêndice B e estimar a massa molar das bandas desconhecidas.



Apêndice D2 - Análise de intensidade do SDS-PAGE. Cada faixa do gel (direita) está acompanhado (esquerda) da curva de intensidade de cor da banda (x, largura) em função da distância de migração das moléculas (y, altura). A intensidade de cor das bandas é relativa a concentração de proteína na região e, portanto, é possível estimar a fração mássica de moléculas a partir da área dos picos. A razão entre a área da intensidade de uma banda pela área total das bandas é equivalente a massa de moléculas pertencentes àquela banda.



APÊNDICE E

Apêndice E - Perdas de massa e temperatura de degradação (T_{onset}) das penas de frango e queratinas precipitadas com ácido clorídrico (KHA), ácido cítrico (KCA), cloreto de sódio (KSC) e acetona (KAT).

Amostra	Perda de massa (%)			Cinzas	Estabilidade T_{onset} (°C)
	Umidade	105 - 440	440 - 700		
CFF	6,1	54,2	35,9	2,3	236,7
KHA	4,7	60,1	31,5	3,7	144,0
KCA	3,3	65,1	32,3	0,0	138,5
KSC	3,5	57,6	25,2	13,8	150,9
KAT	3,6	64,6	31,8	0,0	152,4

APÊNDICE F

Apêndice F1 - Categorias de impacto ambiental em valores absolutos da produção de 1 tonelada de queratina precipitada com ácido clorídrico (KHA), ácido cítrico (KCA), cloreto de sódio (KSC) e acetona (KAT).

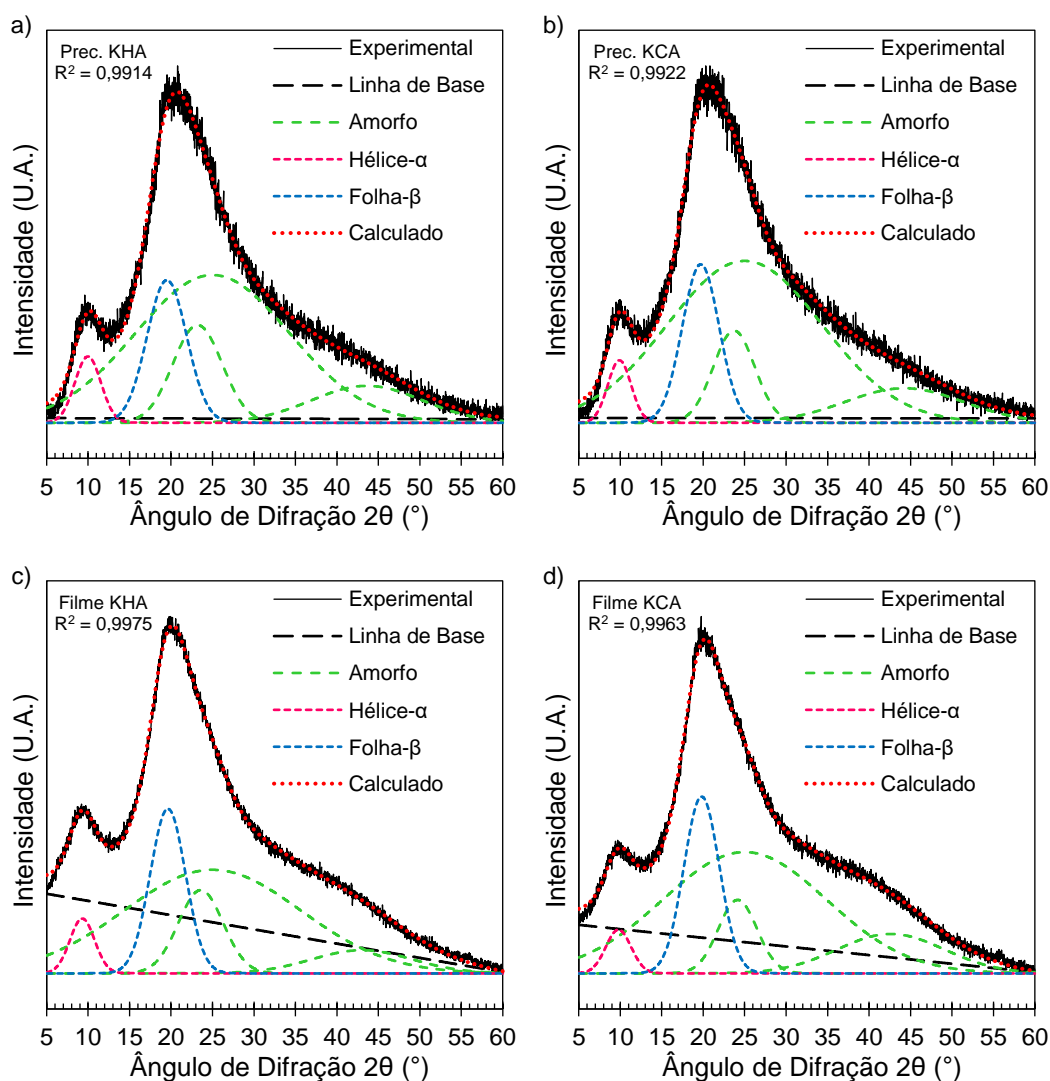
Categoria de impacto ambiental	Unidade	KHA	KCA	KSC	KAT
Formação de particulados	kg PM _{2,5} eq.	721,5	694,3	836,2	537,9
Escassez de recursos fósseis	ton oil eq.	76,9	73,6	88,8	133
Ecotoxicidade de água doce	ton 1,4-DCB	10,1	10,1	12,1	11,8
Eutrofização de água doce	kg P eq.	63,6	63	75,1	65,5
Aquecimento global	ton CO ₂ eq.	328,1	315,3	379,1	331,9
Toxicidade humana carcinogênica	ton 1,4-DCB	13,1	12,9	15,7	14,9
Toxicidade humana não carcinogênica	ton 1,4-DCB	176,4	175	210,6	216,6
Radiação ionizante	MBq Co-60 eq.	34,1	32	39,1	20
Uso de terra	10 ³ m ² a crop eq.	124	116,6	143,2	52
Ecotoxicidade marinha	ton 1,4-DCB	12,5	12,5	15	15
Eutrofização marinha	kg N eq.	296,7	277,8	343,1	123,9
Escassez de recursos minerais	kg Cu eq.	1172,6	1253,6	1398,5	1736,1
Depleção da camada de ozônio, saúde humana	kg NO _x eq.	696,4	671,2	807,4	854,7
Depleção da camada de ozônio, ecossistemas terrestres	kg NO _x eq.	719,1	692,4	833,6	1001,6
Depleção do ozônio estratosférico	kg CFC11 eq.	1,9	1,8	2,2	0,8
Acidificação terrestre	kg SO ₂ eq.	2930,1	2785,7	3386,7	1783,3
Ecotoxicidade terrestre	ton 1,4-DCB	514,7	500,3	599,8	546,5
Consumo de água	10 ³ m ³	26,7	24,8	30,6	13,1

Apêndice F2 - Categorias de impacto ambiental em valores absolutos da produção de 1 tonelada de queratina precipitada com acetona (KAT) e o impacto de sua reciclagem de 25 (KAT_25), 50 (KAT_50), 75 (KAT_75) e 90% (KAT_90) do volume utilizado.

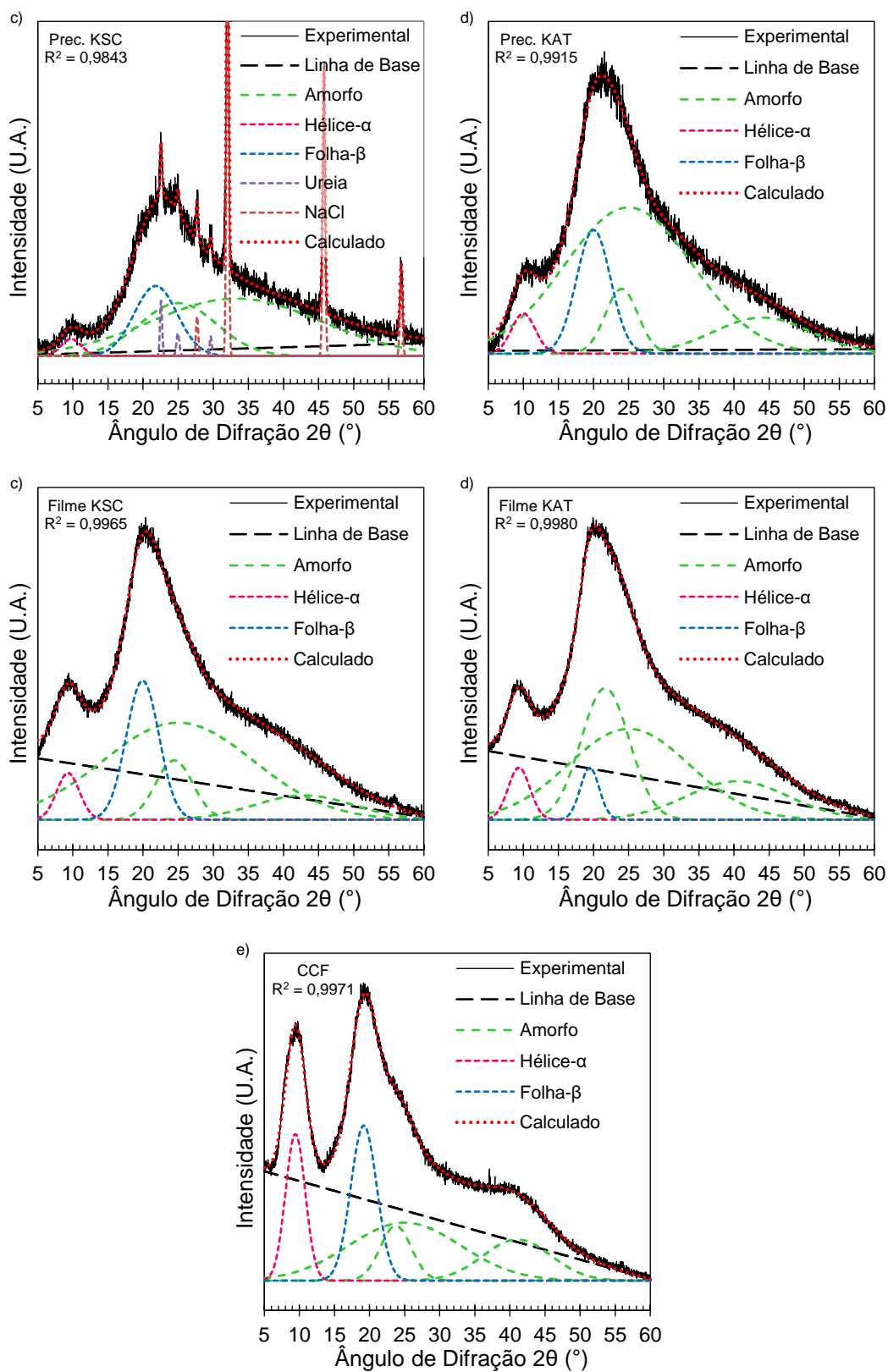
Categoria	Unidade	KAT	KAT_25	KAT_50	KAT_75	KAT_90
Formação de particulados	kg PM _{2,5} eq.	537,9	480,5	423,1	365,7	331,3
Escassez de recursos fósseis	ton oil eq.	133	108,3	83,5	58,8	44
Ecotoxicidade de água doce	ton 1,4-DCB	11,8	9,9	8,1	6,2	5,1
Eutrofização de água doce	kg P eq.	65,5	55,8	46,1	36,4	30,6
Aquecimento global	ton CO ₂ eq.	331,9	285,3	238,6	192	164
Toxicidade humana carcinogênica	ton 1,4-DCB	14,9	12,6	10,3	8	6,6
Toxicidade humana não carcinogênica	ton 1,4-DCB	216,6	181,4	146,2	111	89,9
Radiação ionizante	MBq Co-60 eq.	20	19	18	17	16,4
Uso de terra	10 ³ m ² a crop eq.	52	51,7	51,4	51,1	50,9
Ecotoxicidade marinha	ton 1,4-DCB	15	12,6	10,3	7,9	6,4
Eutrofização marinha	kg N eq.	123,9	123,3	122,6	122	121,6
Escassez de recursos minerais	kg Cu eq.	1736,1	1424,1	1112,1	800,1	612,9
Depleção da camada de ozônio, saúde humana	kg NO _x eq.	854,7	716,4	578,1	439,8	356,8
Depleção da camada de ozônio, ecossistemas terrestres	kg NO _x eq.	1001,6	829	656,4	483,8	380,2
Depleção do ozônio estratosférico	kg CFC11 eq.	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Eutrofização terrestre	kg SO ₂ eq.	1783,3	1644	1504,8	1365,6	1282
Ecotoxicidade terrestre	ton 1,4-DCB	546,5	465,8	385,2	304,5	256,1
Consumo de água	10 ³ m ³	13,1	12,8	12,5	12,2	12

APÊNDICE G

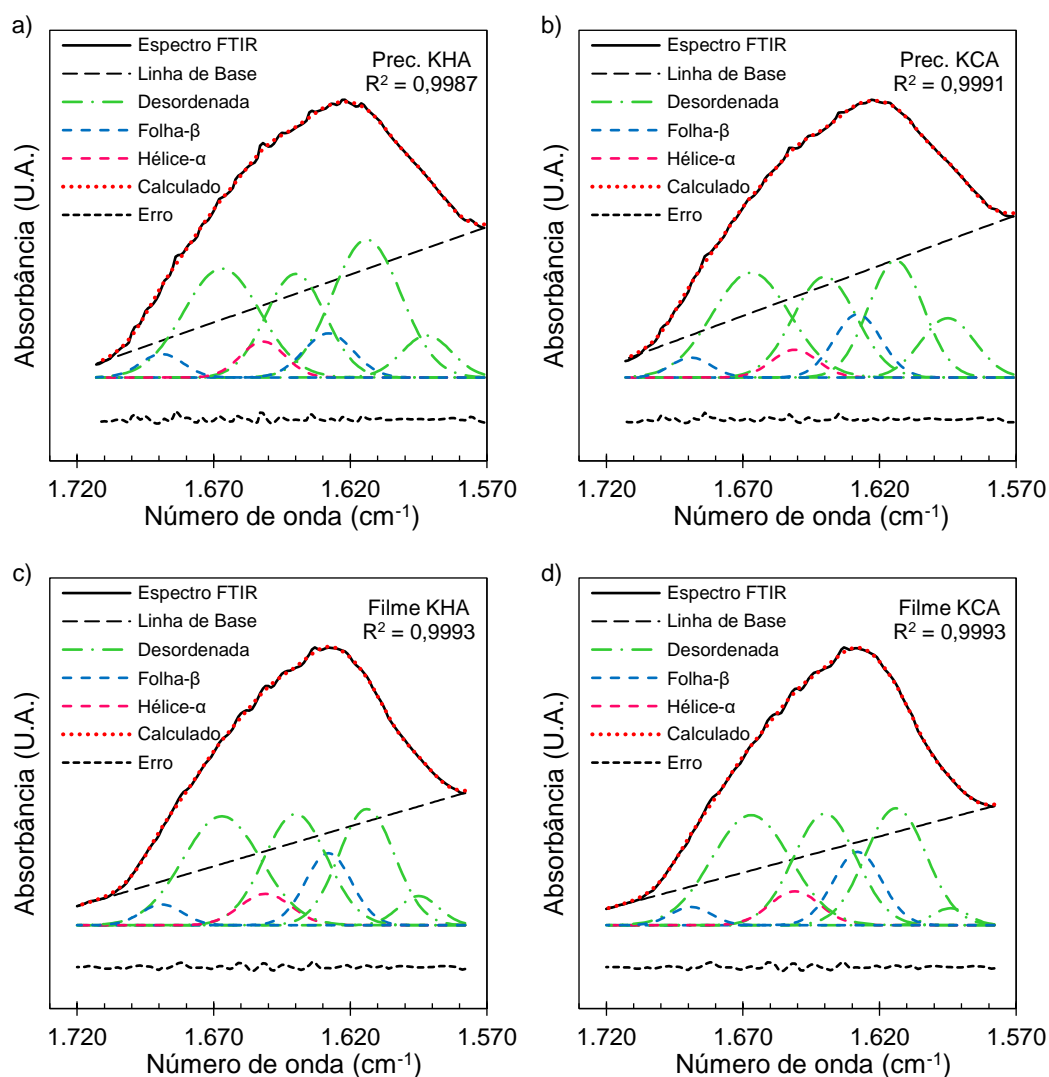
Este apêndice é destinado as curvas de deconvolução de picos e bandas das análises de DRX e ATR-FTIR. As frações das estruturas hélice- α (rosa, $\sim 9^\circ$) e folha- β (azul, $\sim 20^\circ$) foram estimadas pela área abaixo de suas respectivas gaussianas em relação a área total modelada.



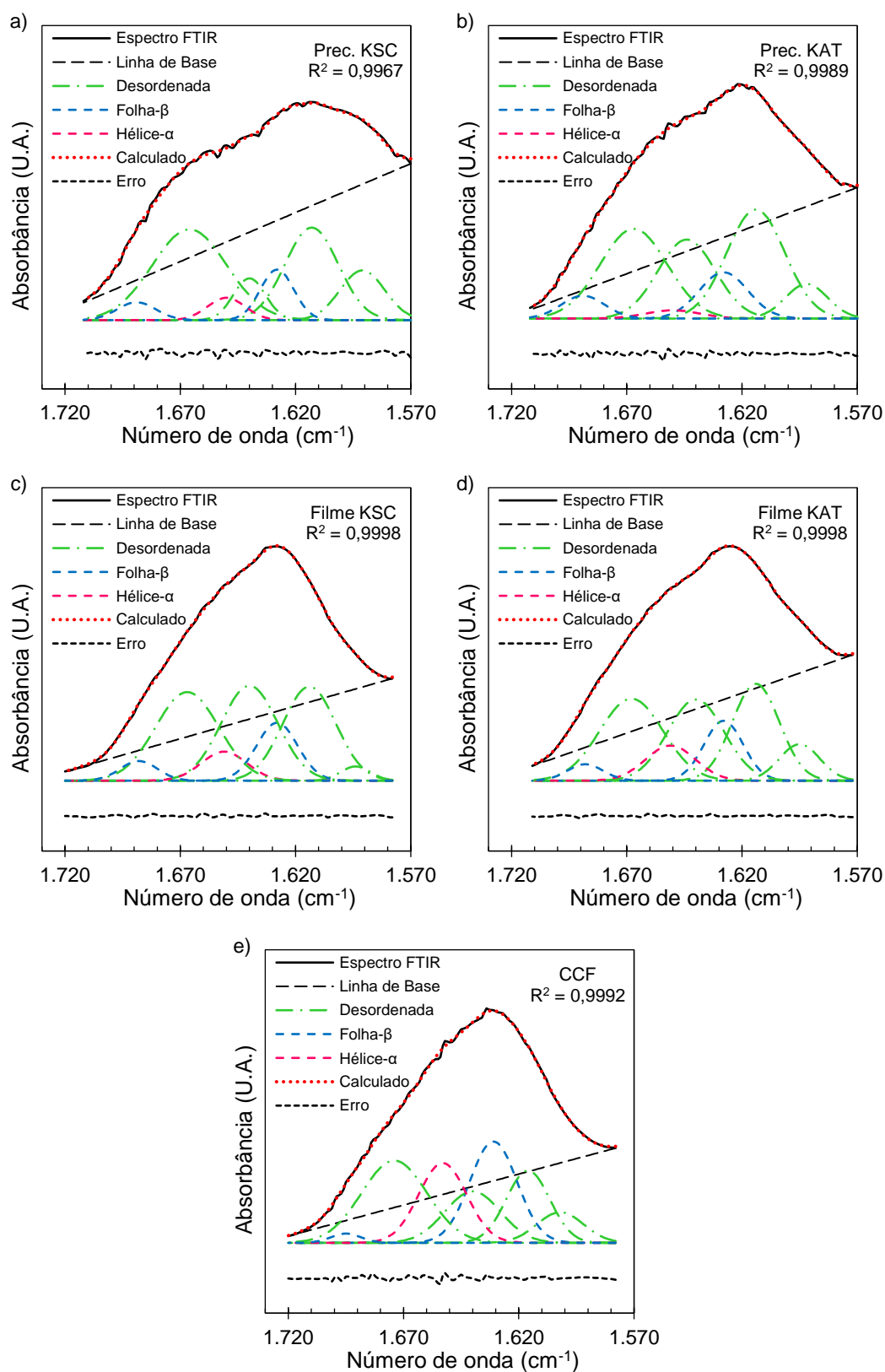
Apêndice G1 - Deconvolução dos padrões de DRX da queratina precipitada por (a) ácido clorídrico (Prec. KHA) e (b) ácido cítrico (Prec. KCA), assim como dos filmes por (c) ácido clorídrico (Filme KHA) e (d) ácido cítrico (Filme KCA).



Apêndice G2 - Deconvolução dos padrões de DRX da queratina precipitada por (a) NaCl (Prec. KSC) e (b) acetona (Prec. KAT), além dos filmes por (c) NaCl (Filme KSC), (d) acetona (Filme KAT) e as (e) penas de frango (CCF).



Apêndice G3 - Deconvolução da Amida I dos espectros de queratina precipitada por (a) ácido clorídrico (Prec. KHA) e (b) ácido cítrico (Prec. KCA), assim como dos filmes por (c) ácido clorídrico (Filme KHA) e (d) ácido cítrico (Filme KCA).



Apêndice G4 - Deconvolução da Amida I da queratina precipitada por (a) NaCl (Prec. KSC) e (b) acetona (Prec. KAT), além dos filmes por (c) NaCl (Filme KSC), (d) acetona (Filme KAT) e as (e) penas de frango (CCF).