

DESARROLLO DE METODOLOGÍAS PARA LA OBTENCIÓN DE PRODUCTOS A BASE DE QUERATINA A PARTIR DE RESIDUOS DE LA INDUSTRIA AVÍCOLA: CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y APLICACIONES TECNOLÓGICAS AMBIENTALES

TESIS DE MAESTRÍA

DRA. JULIANA M. ORJUELA PALACIO
DIRECTORA: DRA. NOEMÍ ZARITZKY
FACULTAD DE INGENIERÍA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE INGENIERIA

Tesis de Maestría

DESARROLLO DE METODOLOGÍAS PARA LA OBTENCIÓN DE
PRODUCTOS A BASE DE QUERATINA A PARTIR DE
RESIDUOS DE LA INDUSTRIA AVÍCOLA: CARACTERIZACIÓN
FISICOQUÍMICA Y APLICACIONES TECNOLÓGICAS
AMBIENTALES

Tesista: Juliana M. Orjuela Palacio

Directora: Dra. Noemí Zaritzky

2023

DESARROLLO DE METODOLOGÍAS PARA LA OBTENCIÓN DE
PRODUCTOS A BASE DE QUERATINA A PARTIR DE
RESIDUOS DE LA INDUSTRIA AVÍCOLA: CARACTERIZACIÓN
FISICOQUÍMICA Y APLICACIONES TECNOLÓGICAS
AMBIENTALES

Tesis de Maestría

Dra. Juliana M. Orjuela Palacio

Presentada ante la Facultad de Ingeniería de la Universidad
Nacional de La Plata como requisito para la obtención del
grado académico de:

Magister en Tecnología e Higiene de los Alimentos (MTHA)

Dirección de tesis:

Dr.a Noemí Zaritzky

El presente trabajo de Tesis se realizó para optar al título de Magister en Tecnología e Higiene de los Alimentos, programa acreditado por CONEAU con Categoría A (Res. 418/12)

Se llevó a cabo en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), bajo la dirección de la Dra. Noemí Zaritzky.



*A MIS PADRES, MI INSPIRACIÓN Y MI FUERZA PARA SEGUIR
SIEMPRE ADELANTE.*

A MI ESOSO, MI APOYO INCONDICIONAL.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis padres que sin importar la distancia y el paso del tiempo me acompañan y apoyan en mi proyecto de vida; John Jairo y Martha, que mis logros les den un poquito de felicidad y compensen mis ausencias, siempre en mi corazón.

A mi esposo, mi compañero y aliado, mi gran apoyo y familia en Argentina. Alejandro, de tu mano es más fácil afrontar cada reto y cada obstáculo que se me presenta, tu compañía me da fuerza para continuar luchando por mis metas y construyendo nuestros sueños.

A mi directora Mimi, gracias por todo el apoyo y la paciencia en el desarrollo de este proyecto de investigación, gracias por las herramientas, los recursos brindados y el tiempo dedicado. Eres una gran guía en mi formación académica y profesional.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, John y Belén, su compañía y ocurrencias hicieron más ameno las jornadas de laboratorio y oficina, crear y trabajar junto a ustedes ha sido una grata experiencia.

Al CONICET (Concejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas) por la financiación brindada a través de diferentes proyectos y subsidios de investigación.

A la Universidad Nacional de la Plata (UNLP) y a la Facultad de Ingeniería por los espacios de formación prestados durante estos años.

A todo el personal del CIDCA, Investigadores, Becarios, Personal de Apoyo, Técnicos y Administrativos, Servicios generales; por participar y colaborar en las actividades requeridas para desarrollar el proyecto de investigación.

RESUMEN

El aprovechamiento de los residuos industriales para la obtención de productos con alto valor agregado constituye un reto de gran interés. Argentina por sus niveles de producción de carne de aves es uno de los principales generadores de biomasa de plumas; los altos niveles de generación y las escasas estrategias para la correcta disposición de esta biomasa pueden afectar significativamente las condiciones ambientales y de la calidad de vida de las poblaciones cercanas. Las plumas son fuente de queratina un biopolímero proteico de alto valor, biodegradable y biocompatible, por lo tanto, podrían revalorizarse como materia prima para la obtención de diferentes productos a base de queratina con mayor valor agregado, tales como, películas, esponjas, hidrogeles, entre otros, con potencial aplicación en diversas industrias como la alimentaria, agrícola, biomédica, farmacéutica y cosmética. Teniendo en cuenta la disponibilidad y el valor de la biomasa surge el interés de proponer alternativas tecnológicas para la obtención de queratina y biomateriales a base de la proteína, mitigando los efectos negativos a nivel ambiental que pueden generar el sector productivo avícola.

En el presente trabajo de tesis se presentan la aplicación de alternativas tecnológicas para el aprovechamiento de residuos de la industria avícola en la obtención de queratina y productos derivados con mayor valor agregado, mitigando los efectos negativos a nivel ambiental que pueden generar dichos residuos. Se propuso la utilización de reactivos menos contaminantes/tóxicos, con menores efectos nocivos para el manipulador y el medio ambiente a los convencionalmente empleados. Se buscó optimizar las condiciones (temperatura, tiempo de reacción, concentración de los reactivos, etc.) de los diferentes procesos de obtención en función de aumentar los rendimientos y

minimizar los costos. Entre estos procesos ensayados se encuentran la reducción con sulfuro de sodio, la hidrólisis alcalina con hidróxido de sodio; incluyendo modificaciones químicas entre las que se encuentran la carboximetilación con ácido monocloroacético y la sulfitólisis oxidativa con Sulfito de sodio y peróxido de hidrógeno. Además, se utilizaron otros agentes químicos para impartir características funcionales a las proteínas extraídas como la urea, sulfito de sodio, dodecilsulfato sódico. Se destaca la importancia de las condiciones de proceso en las metodologías de solubilización de plumas de pollo, donde la temperatura y el tiempo demostraron ser factores clave para mejorar el rendimiento de solubilización y el contenido de proteína soluble. Se encontró que aplicar la temperatura de 60 °C durante 1 h en los procesos de reducción con Na₂S (Red 1) y NaOH (H1) resulta en un mayor rendimiento de solubilización y contenido de proteína soluble. Las metodologías Red 1 y H1 demostraron los mayores porcentajes de rendimiento de solubilización (%Plumasol > 83 %) y proteína soluble extraída. Para ambos casos, se observó una ruptura significativa de los enlaces disulfuro presentes en la queratina, alcanzando aproximadamente un 50%. Mediante la modificación química utilizando ácido monocloroacético (MCA), se logró la modificación de los grupos -SH libres. La concentración de MCA al 0,5 %m/v produjo una modificación más notoria en comparación con el MCA al 0,2 %. Las metodologías Red 1 y H1 se perfilan como opciones viables y económicas para reemplazar la metodología convencional con el uso de reductores menos amigables con el ambiente como el 2-Mercaptoetanol.

El análisis térmico utilizando Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) reveló diferencias en las temperaturas y entalpías de desnaturalización de las fracciones que componen las plumas de pollo. Estas diferencias se atribuyeron al ordenamiento molecular y empaquetamiento de la estructura de queratina, que variaron según la biomasa de partida y la fracción analizada. Los derivados de queratina, tanto los modificados como los no modificados, mostraron una alta resistencia térmica, con transiciones térmicas en el rango de 150 a 250 °C. La caracterización de la estructura mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) confirmó la presencia de picos característicos asociados a diferentes fracciones de la molécula de queratina en los productos en polvo obtenidos mediante las metodologías de reducción e hidrólisis, con o sin etapa de modificación. Además, se identificaron los principales grupos funcionales (C-S y S-H) en los productos resultantes.

Uno de los ejes centrales del trabajo fue la modificación de metodologías de solubilización de la biomasa en busca de procesos viables, económicos y escalables; para este fin se buscó sustituir la etapa de diálisis (difícil de implementar a nivel industrial) por fases de lavado/precipitado. Este cambio se aplicó a las metodologías de reducción con Na_2S e hidrólisis con NaOH y permitieron la correcta obtención de los derivados de queratina. Se destaca que estos productos tendrían posibles aplicaciones ambientales, no siendo necesario una purificación exhaustiva de la proteína.

En una segunda etapa, a partir de la queratina soluble se propusieron metodologías para el diseño de materiales eco-compatibles como esponjas de queratina, usando el secado por liofilización que permite la formación de matrices

gracias a la capacidad autoensamblante 3D de la queratina. Las metodologías aplicadas fueron: sulfitolisis, diálisis y liofilización.

Las condiciones de procesamiento se ajustaron para lograr materiales con una estructura óptima y un mejor rendimiento. Se aplicó autoensamblado 3D para formar matrices porosas utilizando etapas de diálisis y secado por liofilización. Se introdujo una metodología alternativa con mezclas de L-cisteína/urea como agente reductor en un proceso de solubilización a tiempos cortos y temperaturas bajas que no requería la etapa de diálisis, generando esponjas autoportantes, compactas, económicas y no tóxicas.

Las esponjas de queratina resultantes presentaron baja solubilidad en agua a $\text{pH} < 9$ y alta estabilidad térmica. El análisis de sorción indicó que el agua era absorbida en multicapas, y el modelo de GAB ajustó satisfactoriamente los datos experimentales. El análisis estructural por FTIR-ATR confirmó la conservación de los principales grupos funcionales de la queratina y detectó cambios químicos generados por los tratamientos.

Los biomateriales de queratina en formato de esponjas permiten aprovechar las propiedades del biopolímero proteico en aplicaciones tecnológicas ambientales como el control de derrames de sustancias de carácter oleoso como crudo en fuentes hídricas, contribuyendo a subsanar el impacto negativo por contaminación de diferentes sectores industriales.

La cinética de sorción de crudo de las esponjas de L-cisteína/Urea utilizadas (con una geometría definida), mostró que el equilibrio se alcanzaba en 15 minutos, lo que definió el tiempo de contacto mínimo. En particular, las esponjas demostraron un alto rendimiento como absorbentes para la contención de derrames de crudo, con capacidad de absorción y retención efectivas. Esto tiene

implicaciones en la revalorización de las plumas como biomasa y en la mitigación de daños socio-ambientales por derrames de crudo.

En resumen, este trabajo de investigación es de suma importancia en el campo de la revalorización de residuos agroindustriales y la generación de nuevos biomateriales. La producción masiva de plumas de pollo en Argentina y su aprovechamiento para la obtención de esponjas de queratina de alto valor agregado resulta un logro significativo. La adopción de metodologías menos agresivas y más sostenibles para la solubilización de queratina ha demostrado ser viable y efectiva, reduciendo el impacto ambiental y los riesgos asociados a agentes químicos convencionales.

Este estudio presenta una alternativa tecnológica en la producción de biomateriales a base de queratina, no solo abordando la problemática de residuos de la industria avícola, sino también generando materiales con múltiples aplicaciones posibles en diferentes industrias, desde la alimentaria y agrícola hasta la biomédica y cosmética. La producción de esponjas de queratina con características funcionales y su alto desempeño en la sorción y retención de sustancias oleosas, como el crudo, abre nuevas perspectivas para la mitigación de impactos ambientales causados por derrames industriales.

Finalmente, este trabajo de tesis contribuye al desarrollo de soluciones ambientales y tecnológicas integrales, al mismo tiempo que proporciona un ejemplo de cómo la revalorización de residuos agroindustriales puede generar impactos positivos en diversos ámbitos, mejorando la sostenibilidad de la industria avícola, reduciendo la contaminación ambiental y ofreciendo nuevos productos con aplicaciones beneficiosas en múltiples sectores.

PUBLICACIONES

- **ORJUELA-PALACIO, J. M., J. & N. E. ZARITZKY. (2023).** Esponjas de Queratina con capacidad de sorción de hidrocarburos, obtenidas a partir de residuos de la Industria avícola. Ciencia Y Tecnología Agropecuaria, vol. 24, n.º 1, febrero de 2023, doi:10.21930/rcta.vol24_num1_art:2830.

CONGRESOS

- **ORJUELA-PALACIO, JULIANA MARCELA; SAIZ MANUELA; ZARITZKY, NOEMÍ (2023).** Caso de economía circular: generación de materiales de queratina eco-compatibles y reutilizables con aplicaciones ambientales como modelo de reconversión de la biomasa del sector avícola. Simposio Internacional de Innovación y Desarrollo de Alimentos. Fundación LATU, Montevideo, Uruguay.
- **ORJUELA-PALACIO, JULIANA MARCELA; GIMENEZ, BELEN; PEREZ JOHN; ZARITZKY, NOEMÍ (2023).** Aprovechamiento de la biomasa residuo de la industria avícola para la generación de materiales ecocompatibles con aplicaciones ambientales y alimentarias, en el marco de la economía circular.
 - **ORJUELA-PALACIO, JULIANA MARCELA; ZARITZKY, NOEMÍ (2023).** Evaluation of methods for the synthesis of biodegradable sponges for oil spills from residues of the poultry industry. WCCE 11th world congress of chemical engineering, Bueno Aires| ARGENTINA
 - **ORJUELA-PALACIO, JULIANA MARCELA; SCIAMMARO LEONARDO; ZARITZKY, NOEMÍ (2023).** Método alternativo de obtención de queratina empleando sulfuro de sodio sin diálisis para la reconversión de biomasa de la industria avícola. TRABAJO COMPLETO | 7° Jornadas de Investigación, Transferencia, Extensión y Enseñanza | Facultad de Ingeniería, UNLP | ARGENTINA
 - **ORJUELA-PALACIO, JULIANA MARCELA; PEREZ CALDERON, JOHN; ZARITZKY, NOEMÍ (2022).** Desarrollo de películas biocompuestas de Quitosano con incorporación de Queratina obtenida de residuos de la industria avícola. Congreso Latinoamericano de Ingeniería y Ciencias Aplicadas CLICAP 2022- San Rafael, Mendoza- Argentina. Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria, Universidad Nacional de Cuyo. - CLICAP 2022
 - **ORJUELA-PALACIO, JULIANA MARCELA; ZARITZKY, NOEMÍ (2022).** -"Síntesis de esponjas de queratina aplicando L-cisteína/Urea como alternativa para la valorización de los residuos del sector avícola. Congreso Latinoamericano de Ingeniería y Ciencias Aplicadas CLICAP 2022- San Rafael, Mendoza- Argentina. Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria, Universidad Nacional de Cuyo. - CLICAP 2022
 - **ORJUELA PALACIO, JULIANA; ZARITZKY NOEMÍ. (2021)** Esponjas de queratina con capacidad sorbente de hidrocarburos, obtenidas a partir de

residuos de la industria avícola; PONENCIA | VII Congreso Internacional de Ingeniería Agroindustrial - CIIA 2021 |Universidad Pontificia Bolivariana | COLOMBIA | 2021

- **ORJUELA PALACIO, JULIANA; ZARITZKY NOEMÍ. (2021)** Evaluación de las condiciones del proceso de extracción de queratina mediante hidrolisis alcalina con hidróxido de sodio; TRABAJO COMPLETO | 6° Jornadas de Investigación, Transferencia, Extensión y Enseñanza | Facultad de Ingeniería, UNLP | ARGENTINA

- **ORJUELA-PALACIO, JULIANA MARCELA.; ZARITZKY, NOEMÍ. (2021)** Carboximetilación de queratina obtenida a partir de plumas de pollo. *IV Jornadas de Investigadores en Formación CyT UNQ.* Quilmes-Buenos Aires, Argentina.

- **ORJUELA-PALACIO, JULIANA MARCELA; LIVIO, FERNANDO; LANARI, M.C; ZARITZKY, NOEMÍ ELISABET. (2018)** Desarrollo y caracterización de matrices a base de queratina obtenida de residuos de la industria avícola. Argentina. San rafael. Libro. Resumen. Congreso. Congreso Latinoamericano de Ingeniería y Ciencias Aplicadas CLICAP 2018- San Rafael, Mendoza- Argentina. Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria, Universidad Nacional de Cuyo. **Ponencia**

- **ORJUELA-PALACIO, JULIANA MARCELA; LANARI, M. CECILIA; ZARITZKY, NOEMÍ ELISABET. (2015)** Desarrollo de productos a base de queratina a partir de residuos de la industria avícola. Argentina. La Plata. Libro. Artículo Completo. Jornada. III Jornadas de Investigación, Transferencia y Extensión. Universidad Nacional de La Plata-Facultad de Ingeniería.

- **ORJUELA-PALACIO, JULIANA MARCELA; LANARI, M.C; ZARITZKY, N. (2014)** Productos a base de queratina a partir de residuos de la industria avícola. Argentina. Concordia. Libro. A. Congreso. International Conference on Food Innovation. Universidad Nacional de Entre Ríos.

- **ORJUELA-PALACIO, JULIANA MARCELA; ZARITZKY, N; LANARI, M.C. (2011)** obtención de productos solubles a base de queratina a partir de residuos de la industria avícola. Argentina. San Rafael, Mendoza. Revista. Resumen. Congreso. Congreso Latinoamericano De Ingeniería Y Ciencias Aplicadas. Universidad Nacional De Cuyo.

Tabla de contenido

Capítulo I. Introducción

1. Introducción.....	1
1.1 La industria avícola	2
1.1.1 Producción nacional	2
1.1.2 Faena y producción de carne aviar	2
1.1.3 Residuos de la industria avícola	4
1.2 Composición de la pluma	5
1.3 Queratina.....	8
1.3.1 Fuentes de queratina.....	9
1.3.2 Estructura de la queratina.....	10
1.3.3 Clasificación de las queratinas	11
1.3.4 Interacciones químicas de la queratina.....	13
1.3.5 Composición química de las queratinas.....	14
1.3.6 Queratina de plumas de pollo	15
1.4 Métodos usados para la producción de queratina	15
1.4.1 Otras metodologías de extracción de queratina	18
1.5 Aplicaciones	20
1.5.1 Industria cosmética.....	20
1.5.2 Industria farmacéutica y aplicaciones biomédicas	21
1.5.3 Agronomía y Agroindustria	22
1.5.4 Aplicaciones ambientales	22
<i>Farmacéutica y aplicaciones biomédicas.....</i>	<i>24</i>
1.6 Planteamiento del problema.....	26
1.7 Justificación general.....	27
1.8 Objetivo general.....	28

Capítulo II. Técnicas de caracterización

2.1. Adecuación de plumas de pollo	30
2.1.1 Fraccionamiento de las plumas	31
2.2 Caracterización de las plumas de pollo.....	32
2.2.1 Humedad.....	32
2.2.2 Determinación del contenido de cenizas.....	32
2.2.3 Determinación del contenido de proteína cruda.....	33

2.2.4	Determinación de proteína soluble	34
2.2.5	Determinación de turbidez	36
2.2.6	Grado de modificación (Determinación de Sulfhidrilos):.....	36
2.2.7	Liofilización de la queratina.....	38
2.3	Metodologías de caracterización aplicadas a los productos derivados de queratina.....	39
2.3.1	Evaluación del peso molecular de los derivados solubles de queratina mediante electroforesis.....	39
2.3.2	Isotermas de sorción	41
2.3.3	Análisis del comportamiento térmico de las plumas de pollo y los derivados de queratina por Calorimetría Diferencial de Barrido	43
2.3.4	Espectroscopía Infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)	45
2.3.5	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) con Reflectancia total atenuada (ATR).....	48
2.3.6	Determinación de la microestructura mediante microscopía electrónica de barrido	49
2.3.7	Análisis textural	50

Capítulo III. Metodologías de solubilización de plumas de pollo para la obtención de queratina

3.1	Introducción	54
3.1.1	Métodos químicos de reducción de queratina:.....	54
3.1.2	Métodos químicos de oxidación de queratina	59
3.1.3	Método químico de hidrólisis con hidróxido de sodio:	61
3.1.4	Modificaciones químicas.....	62
3.2	Objetivos específicos del Capítulo 3	68
3.3	Metodologías de solubilización de plumas de pollo.....	69
3.3.1	Método convencional de solubilización por reducción con tioles (agente reductor 2-mercaptoetanol).....	69
3.3.2	Método de solubilización por reducción con Sulfuro de sodio (Na ₂ S)	70
3.3.3	Método de solubilización por hidrólisis con Hidróxido de sodio (NaOH)	71
3.3.4	Etapas de modificación.....	71
3.3.5	Diálisis	73
3.3.6	Obtención de queratina en polvo	75
3.4	Caracterización de derivados solubles de queratina:	75

3.4.1 Rendimiento de extracción	75
3.4.2 Medición del pH	75
3.4.3 Determinación de proteína soluble y turbidez	76
3.4.4 Grado de modificación (Determinación de Sulfhidrilos):.....	76
3.4.5 Análisis del comportamiento térmico por Calorimetría diferencial de barrido	76
3.4.6 Espectroscopía Infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)	77
3.4.7 Ensayo de solubilidad de los derivados de queratina liofilizados	78
3.4.8 Análisis estadístico	78
3.5 Resultados y discusión	79
3.5.1 Caracterización de la materia prima.....	79
3.5.2 Caracterización de los derivados solubles	79
3.5.3 Obtención de queratina en polvo	88
3.5.4 Análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	90
3.5.5 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)	94
3.6 PARTE B: Metodologías escalables para la obtención de queratina a partir de plumas de pollo.....	99
3.6.1 Condiciones de solubilización de plumas de pollo	99
3.6.2 Resultados y discusión	101
3.7 Conclusiones del capítulo II	111

Capítulo IV. Biomateriales porosos de queratina a partir de la biomasa de plumas de pollo

4.1 Introducción	115
4.1.1 Aplicaciones de los materiales porosos de queratina.....	116
4.1.2 Biomateriales de queratina como materiales sorbentes para el tratamiento de contaminantes de efluentes industriales: Caso aceites y derivados de hidrocarburos	116
4.2 Objetivos específicos del capítulo IV.....	120
4.3. Parte A. Aplicación de metodologías de sulfitolisis y reducción para la formación de biomateriales de queratina	122
4.3.1. Bio-esponja de queratina E1.....	123
4.3.2 Bio-esponja de queratina E2.....	124
4.4 Caracterización de las esponjas	125
4.4.1 Solubilidad en agua	125
4.4.2 Calorimetría Diferencial de Barrido	126

4.4.3 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) con Reflectancia total atenuada (ATR)	126
4.4.4 Propiedades de sorción de agua de las esponjas	129
4.4.5 Aplicación ambiental	131
4.5.6 Análisis estadístico	132
4.5. Resultados y discusión	132
4.5.1 Solubilidad de esponjas de queratina en agua.....	134
4.5.2 Análisis del comportamiento térmico de las esponjas de queratina por calorimetría diferencial de barrido (DSC)	135
4.5.3 Espectroscopía infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR ATR)	137
4.5.4 Propiedades de sorción de agua de las esponjas	144
4.5.5 Aplicación ambiental en el control de aceite y crudo	146
4.5.6 Modificación del proceso de formación de esponjas	148
4.6 PARTE B: Síntesis de materiales biosorbentes de queratina aplicando L-cisteína/Urea sin diálisis.	150
4.6.1 Procedimiento de extracción de queratina	151
4.6.2 Evaluación del rendimiento de extracción	154
4.6.3 Caracterización fisicoquímica de los biomateriales	155
4.6.4 Aplicación ambiental: captación de crudo	169
4.7 Conclusiones del capítulo	175
Capítulo V. Conclusiones finales	
5. Conclusiones finales	178
REFERENCIAS	182

ABREVIATURAS

(D)	Diálisis
2-MEC	2-Mercaptoetanol
3D	Tridimensional
Abs	Absorbancia
ANOVA	Análisis de varianza
ATR	Reflexión atenuada total
A_w	actividad acuosa
b.h	base húmeda
b.s	base seca
BET	Modelo de Brunauer-Emmett-Teller
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
DTG	Derivada de la masa
DTNB	Reactivo de Ellman: 5,5'-ditio-bis ácido 2-nitrobenzoico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
ES	error estándar
FTIR	Espectroscopía Infrarroja con transformada de Fourier
FWHH	Full Width at the Half-Height
GAB	Modelo de 3 parámetros (Guggenheim-Anderson-de Boer)
IEA	INTERNATIONAL ENERGY AGENCY
IR	Infrarrojo
LMW	Bajo peso molecular
MINEM	Ministerio de Energía y Minería de Argentina
nl	no libera
PM	Peso molecular
Q	Queratina
rpm	Revoluciones por minuto
SCMQ	<i>S-Carboximetil-queratina</i>
SDS	Dodecil sulfato sódico
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SH	Tioles
Sox	Sulfitólisis oxidativa
SS	enlaces disulfuro
TGA	análisis termogravimétrico
T_p	Temperatura de pico (valor máximo)
TPA	Análisis de perfil textural
ULMW	ultrabajo peso molecular
UV	Ultravioleta
VIS	Visible

NOMENCLATURA

% E	Porcentaje de error medio relativo
%CRA	Capacidad de retención de aceite
%CRC	Capacidad de retención de crudo
%H	Contenido de humedad (base húmeda)
%Mod	Porcentaje de modificación química
%PP	Porcentaje de pérdida de peso
%Rend	Rendimiento porcentual de extracción
%Sol	Solubilidad gravimétrica (g material soluble / 100 g material)
%SS	contenido de enlaces disulfuro en muestras sin modificar químicamente
%SS _{mod}	contenido de enlaces disulfuro presentes en la muestra tras la modificación química
A	Parámetro de modelo OWWIN Y HALSEY
B	Parámetro de modelo OWWIN Y HALSEY
C _{GAB}	es la constante de Guggenheim
C _H	Capacidad de hinchamiento (g de agua/ g material)
CSA	Capacidad de sorción de aceite
CSC	Capacidad de sorción de crudo
E1	Metodología de obtención de esponjas (SDS, Na ₂ SO ₃ y urea)
E2	Metodología de obtención de esponjas (Na ₂ SO ₃ y urea T= 65 °C t _{extracción} = 120 min)
H1	solubilización con NaOH durante 1 h a 60 °C con agitación constante. Con diálisis.
H2	solubilización con NaOH durante 2 h a 40 °C con agitación constante. Con diálisis.
k1	Constante de velocidad (min ⁻¹) del modelo de pseudoprimer orden
k2	Constante de velocidad (min ⁻¹) del modelo de pseudosegundo orden
K _{GAB}	factor de corrección relacionado con el calor de sorción de la multicapa, del modelo de GAB
ln	logaritmo natural
M	Molaridad
m/v	Porcentaje masa (g) / volumen (mL)
m _c	masa seco final del proceso de combustión (g)
MCA	Ácido monocloroacético-
mf	masa final (g)
mi	masa inicial (g)
n	número de datos experimentales
Q(a)	solubilización Na ₂ S C _{sol} = 7,8 g/L durante a 60°C y 1 h. Sin diálisis.
Q(b)	solubilización Na ₂ S C _{so} = 10 g/L a 30°C a 3, 6 y 24 h.
q _e	cantidad de crudo sorbido en el equilibrio
q _t	cantidad de crudo sorbido (g/g) a tiempo t
R ²	Coefficiente de determinación

<u>Red 1</u>	solubilización con Na ₂ S 0,1M durante 1 h a 60 °C con agitación constante. Con diálisis.
<u>Red 2</u>	solubilización con Na ₂ S 0,1M durante 2 h a 40 °C con agitación constante. Con diálisis.
T _{desnaturalización}	Temperatura de desnaturalización de la proteína (Tp= Temp. de pico)
t _{eq}	Tiempo de equilibrio de sorción
T _{máx}	Temperatura máxima (TGA)
V _b	volumen de ácido gastado para valorar el blanco (mL)
V _m	volumen de ácido gastado para valorar la muestra (mL)
W _c	humedad del material que corresponde a la situación en que los puntos de adsorción primarios están saturados por moléculas de agua
W _{ci}	valores de humedad experimentales
W _{cp}	valores de humedad predichos
W _m	Contenido de agua de monocapa
ΔH	Entalpía de desnaturalización

INTRODUCCIÓN



1. Introducción

El rápido crecimiento de la industrialización y urbanización para cumplir las demandas de consumo actuales conllevan al aumento sostenido en la generación de residuos. El aprovechamiento de las biomásas de residuos de diferentes sectores industriales para la obtención de productos con alto valor agregado constituye un reto de gran interés, de cara a cambiar los modelos de producción tradicionales de economía lineal basados en **“usar, hacer y desechar”**, por modelos que integren el impacto ecológico y social a los procesos productivos.

En las últimas décadas la economía circular ha tomado mayor relevancia presentándose como una estrategia de aprovechamiento y maximización de los recursos para la producción donde prima la reducción, la reutilización y el reciclaje. La principal característica es que el **residuo se convierte en recurso**, todo el material biodegradable vuelve a la naturaleza y el que no es biodegradable se reutiliza. Hay un creciente interés y necesidad en todo el mundo por disminuir la manufactura y consumo de productos derivados del crudo y por usar fuentes renovables y más sustentables para la generación de productos biodegradables y no tóxicos.

Las biomásas fuente de queratina son colectadas en grandes cantidades de los frigoríficos, curtiembres, industria de la lana y textil, entre otras, los altos niveles de generación y las escasas estrategias para la correcta disposición de estas biomásas pueden afectar significativamente las condiciones ambientales y de la calidad de vida de las poblaciones circundantes. Es imperante la innovación en metodologías apropiadas y económicas para el aprovechamiento de residuos industriales, como la síntesis de biomateriales que puedan ser aplicados en el manejo de contaminantes vertidos a fuentes hídricas que afectan el ecosistema y la calidad de vida de las poblaciones.

1.1 La industria avícola

El sector avícola presenta una tendencia de crecimiento sostenida a nivel mundial, impulsada por el crecimiento demográfico y los procesos de urbanización; el desarrollo y la transferencia de nuevas tecnologías de alimentación, faenado y procesamiento han mejorado la inocuidad y la eficiencia del sector (FAO, 2023).

La producción mundial de carne de pollo alcanzó 100,5 millones de Tn en el 2021, con un incremento de 3,6 % respecto del año anterior, liderando el mercado mundial los Estados Unidos, Brasil, China y Unión Europea (UE). La Argentina ocupa el puesto número 8° en la producción mundial, con una participación total del 2,2 % (Ministerio de Agricultura, ganadería y pesca (MAGyP, 2021)).

1.1.1 Producción nacional

En Argentina, la industrialización de aves de corral es una práctica cotidiana debido a su alta rentabilidad y la elevada calidad de los productos avícolas. La población promedio de aves industriales en Argentina es de 139 millones, el 71,3 % corresponde a pollos de engorde, el 27 % a gallinas de postura, un 1,6 % a reproductores padres y abuelos de ambas líneas genéticas (SENASA, 2020). La producción avícola nacional se encuentra distribuida en las provincias de Entre Ríos (44,43 %), Buenos Aires (42,43 %), Córdoba (5,10 %), Santa Fe (4,20 %) y Río Negro (2,84 %) (MAGyP, 2021).

1.1.2 Faena y producción de carne aviar

En el año 2019 la faena nacional de aves en establecimientos con habilitación de SENASA fue un 6,4 % mayor a la reportada en el 2018; presentó una distribución del 51 % y 36 % en las provincias de Entre Ríos y de Buenos Aires respectivamente (Figura 1.1) (MAGyP, 2021).

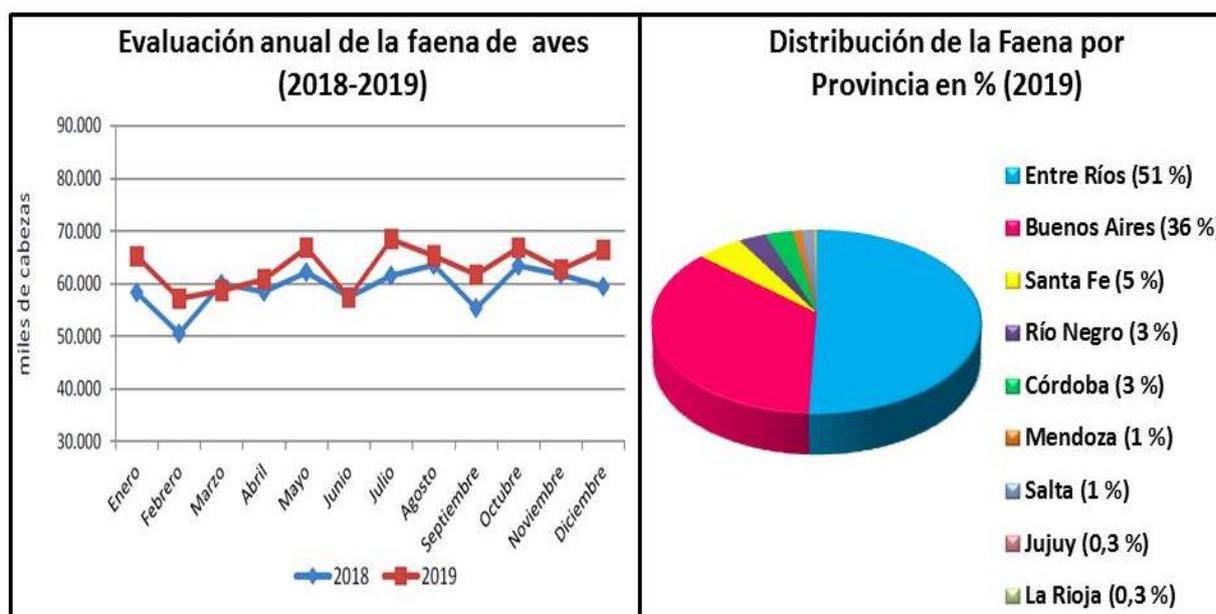


Figura 1.1 Evaluación anual de la faena de aves periodo 2018 - 2019 y distribución por provincias en Argentina. (Fuente: Elaborado por Área Avícola, Dir. de Porcinos, Aves de Granja y No Tradicionales – SSG – MAGyP con datos de SENASA)

La producción de carne aviar estimada a partir de la faena en establecimientos con habilitación nacional, provincial y municipal, para el 2019 alcanzó 2.207 miles de Tn, 6,7 % más que en 2018. Además del crecimiento sostenido del consumo interno, también es importante la exportación constante a distintos países, principalmente China, Sudáfrica, Chile, Arabia Saudita, Angola, entre otros (SENASA, 2018).

Las exportaciones totales avícolas en el 2019 se distribuyeron principalmente en un 35 % China, 13 % Sudáfrica, 8 % Chile, 6 % Vietnam, Rusia y Colombia con 4 % cada uno. El 26 % restante corresponde a Cuba, Arabia Saudita, Angola, Yemen y Hong Kong, entre otros (Ministerio de Agricultura, ganadería y pesca (MAGyP), 2020).

Por lo anterior, el país se ubica como un gran generador de subproductos de esta industria, siendo las plumas un residuo sólido crítico que representa un grave problema para su disposición final.

1.1.3 Residuos de la industria avícola

Los contaminantes potenciales de la industria avícola se generan en las diferentes etapas del proceso; los residuos derivados de la incubación como la gallinaza o guano (excrementos de aves), materiales de construcción de las camas (aserrín, paja, cascarillas de arroz, etc.) y mortalidad en las granjas. En la etapa de faenamiento y procesamiento de las aves se generan otros residuos como las aguas residuales, los biosólidos y los despojos como las vísceras, picos y plumas de los animales faenados (Williams, 2013). La mayoría de estos subproductos pueden ser valiosos si se manejan de manera adecuada y pueden ser fuentes de nutrientes orgánicos e inorgánicos de gran valor, independientemente del tamaño de la parvada; en caso contrario, son vectores de insectos, parásitos y agentes patógenos (Williams, 2013). El manejo de los subproductos avícolas se centra en la calidad del suelo, el agua (degradación de las aguas superficiales y subterráneas debido a los nutrientes y microorganismos patógenos presentes en los desechos avícolas) y el aire (emisiones de amoníaco, sulfito de hidrógeno, compuestos orgánicos volátiles y polvo). Uno de los principales residuos generados en el sector avícola son las plumas; se caracterizan por ser de difícil degradación y cuya disposición final representa un importante problema ambiental. Entre el 7 y el 10 % de la producción de carne de pollo corresponde a los residuos de plumas, alcanzando más de $8 - 9 \times 10^5$ Tn/año (Ningthoujam y col., 2018; Kumar Kumawat y col., 2018).

Los métodos como el quemado y enterrado son utilizados para la disposición final de plumas (Fan y col., 2008). Sin embargo, estos procesos son poco amigables con el medio ambiente debido a que generan gases contaminantes y requieren de grandes lotes de tierra para el relleno de las plumas, siendo su descomposición muy lenta a causa de la resistencia que ofrece la queratina (Fan y col., 2008). En menor

proporción este residuo se destina para la alimentación animal mediante un proceso de esterilización a elevada temperatura y presión (80-140 °C en medio ácido o básico), seguido de un secado y molienda, produciendo polipéptidos solubles en agua, oligopéptidos, e incluso aminoácidos libres. Este proceso es costoso y además tiene como principal inconveniente que se puede causar la destrucción parcial o completa de ciertos aminoácidos esenciales como la lisina, metionina y triptófano, formando otros aminoácidos no nutritivos como la lisinoalanina (no es utilizada por los animales como fuente de lisina), lantionina de cistina y lisina (Ningthoujam y col., 2018).

1.2 Composición de la pluma

Las plumas de pollo constituyen en promedio entre el 6 y 7 % del peso del animal y a su vez están constituidas aproximadamente por un 91-94 % (base seca; b.s.) de una proteína estructural llamada queratina (Martelli y col., 2012, Kock, 2006), 1 al 3 % de lípidos, 8 al 10 % de agua y menos de un 1,5 % de cenizas (Kock, 2006, Tesfaye y col., 2017). Contienen fracciones insignificantes de fibra cruda (Tefaye y col., 2017). La pluma está conformada por un eje central llamado *Calamus* (segmento del eje central desde la unión con la piel hasta la aparición de las barbas), este mismo eje se conoce como *Raquis* a partir de las barbas hasta el final de la pluma (7 cm de longitud en promedio) (Figura 1.2).

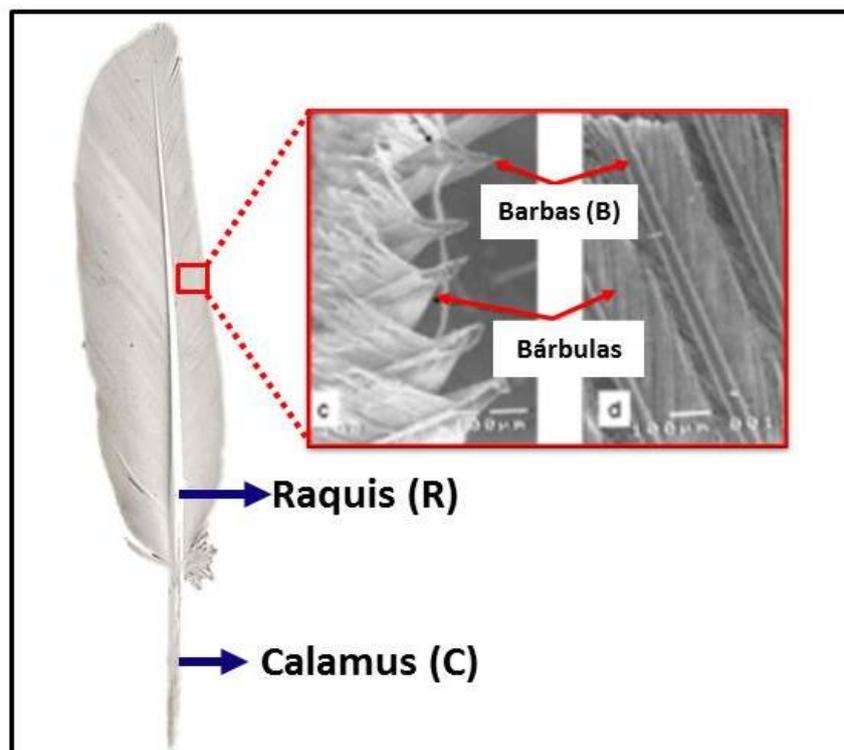


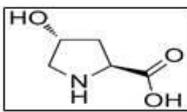
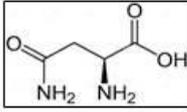
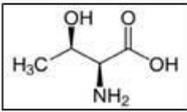
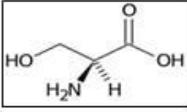
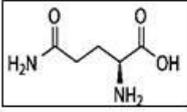
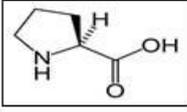
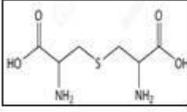
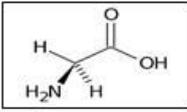
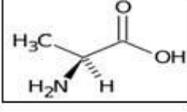
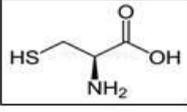
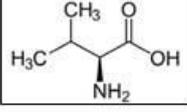
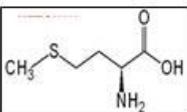
Figura 1.2 Estructura de la pluma. (C) Calamus, (R) Raquis, (B) Barbas y bárbulas (Adaptado de Martínez-Hernández y col., 2012).

Cuenta con una estructura secundaria compuesta por *Barbas* que tienen unidas estructuras microscópicas terciarias denominadas *bárbulas*, con una longitud de entre 0,3 y 0,5 mm en promedio (Martínez-Hernández y col., 2012).

La composición de aminoácidos de las partes de la pluma se presenta en la Tabla 1.1.

Los contenidos de prolina, serina y glicina son elevados, presentan un alto contenido en cisteína (41-44 residuos/1000 residuos).

Tabla 1.1 Composición de aminoácidos de Barbas, Raquis y Cálamus de plumas de pollo (Residuo/1000 residuos). Adaptado de Takahashi y col., (2014).

Aminoácidos	Barbas	Raquis	Cálamus	Total ^(b)
 Hidroxiprolina	0	0	0	0
 Asparagina	53	51	59	63
 Treonina	48	45	44	53
 Serina	152	151	143	157
 Glutamina	87	83	83	86
 Prolina	121	124	104	117
 Lantionina	0	0	0	-
 Glicina	115	113	136	115
 Alanina	57	56	74	56
 Cisteína	44	43	41	42
 Valina	77	75	68	77
 Metionina	3	5	0	3

^(b) total propuesto por Akahane y col., (1977).

1.3 Queratina

Las queratinas componen un grupo de escleroproteínas con diferentes propiedades físicas y químicas, son de origen animal y constituyen los tejidos de sostén del organismo de los vertebrados, junto al colágeno y la elastina. Su principal función es prestar servicio de armadura, protección y defensa en animales.

Se presentan en forma de microfibrillas, están formadas por cadenas de aminoácidos que se enlazan entre sí formando fibrillas (Figura 1.3); las fibrillas están estabilizadas por una gran cantidad de interacciones no covalentes (fuerzas electrostáticas, puentes de hidrógeno, interacciones hidrófobas) e interacciones covalentes (enlaces disulfuro), que deben ser destruidas para una correcta disolución (Salazar Cedillo, 2013).

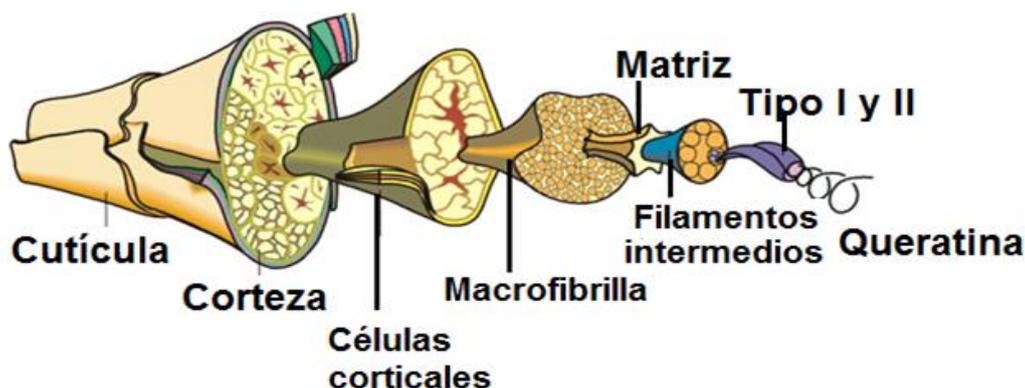


Figura 1.3 Estructura de una fibra de material queratinoso.

Tienen alto contenido de cisteína con filamentos intermedios (IFs) las cuales son elementos del citoesqueleto con 8 a 10 nm de diámetro (Arai y col., 1983; Khosa y col., 2013); los residuos aminoacídicos básicos, ácidos y la cisteína están concentrados en las regiones N y C-terminales (Belarmino y col., 2012). La queratina tiene alta resistencia, fuerza y es insoluble en solventes polares, así como en solventes no polares. La estabilización de la estructura es el resultado de los enlaces

disulfuro intra e intermoleculares, puentes de hidrógeno y su cristalinidad. Estas propiedades pueden diferenciarla de otras proteínas fibrosas como las miofibrilares y el colágeno (Schrooyen y col., 2000). En función de la cantidad de enlaces disulfuro, pueden ser clasificadas como materiales queratinosos blandos, flexibles y extensibles (con pocos enlaces disulfuro), como la epidermis, o duros (con muchos enlaces disulfuro) como pelos o plumas.

1.3.1 Fuentes de queratina

La queratina es el segundo biomaterial de origen animal más abundante después del colágeno (Sharma y Gupta, 2016), proveniente de partes de reptiles, pájaros y mamíferos. Es un constituyente principal de uñas, lana, plumas, cuerno y piel, el cual proporciona fuerza y rigidez (Figura 1.4).



Figura 1.4 Diferentes biomasas fuentes de materiales queratinosos.

La industria alimentaria produce millones de toneladas de residuos resultantes del faenamiento y esquilado de algunos animales. Cerca del 80 % del cabello humano está formado de queratina.

1.3.2 Estructura de la queratina

- **Estructura primaria:** Es la estructura fundamental para la forma tridimensional de la proteína, una modificación en su secuencia aminoacídica puede generar un cambio en su estructura tridimensional y afectar las funciones biológicas (Salazar Cedillo, 2013). La queratina tiene altos contenidos de aminoácidos tales como la glicina, la cisteína, prolina y serina; por otra parte, tiene bajo contenido de lisina, histidina y metionina (Shavandi y col., 2017).
- **Estructura secundaria:** A medida que la cadena de aminoácidos de queratina se va ensamblando, empiezan a tener lugar interacciones entre los diversos aminoácidos de la cadena. Las estructuras α -hélice y hoja β -plegada surgen debido al continuo plegado de la estructura de la cadena polipéptidica, que se da por la formación de puentes hidrógeno entre el oxígeno de los grupos carboxilo y el hidrógeno amino (Figura 1.5).

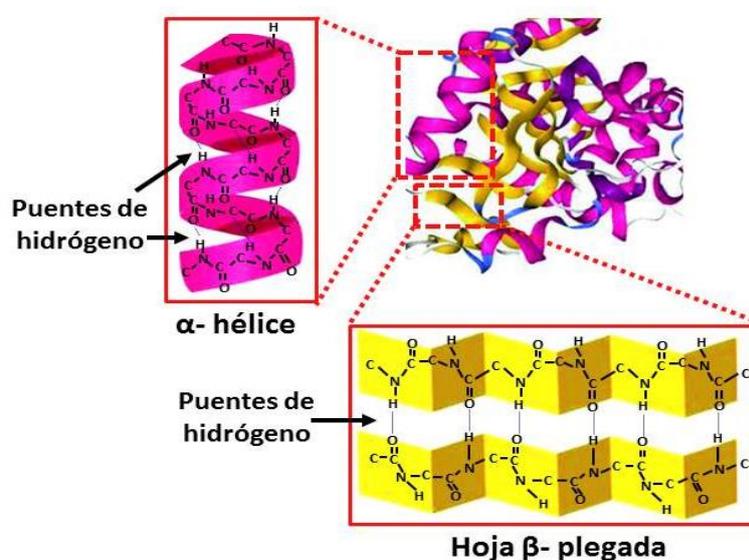


Figura 1.5 Estructura secundaria de la queratina, α -hélice y hoja β -plegada.

Estructura terciaria: La interacción de los grupos R de los aminoácidos provoca que la cadena polipeptídica se pliegue dando lugar a una estructura tridimensional. Los protómeros de queratina, (cada una de las cadenas de queratina que constituye una espiral α -hélice) se unen entre sí para formar *dímeros* (par de espirales) (Figura 1.6); posteriormente, se unen dos dímeros para formar tetrámeros, muchas uniones de tetrámeros dan lugar a los *protofilamentos* (Salazar Cedillo, 2013). Finalmente, la unión de grupos de cuatro protofilamentos forma una *protofibrilla* (Figura 1.6), la unión de muchas protofibrillas y su torsión para generar un trenzado forman grandes moléculas de queratina.

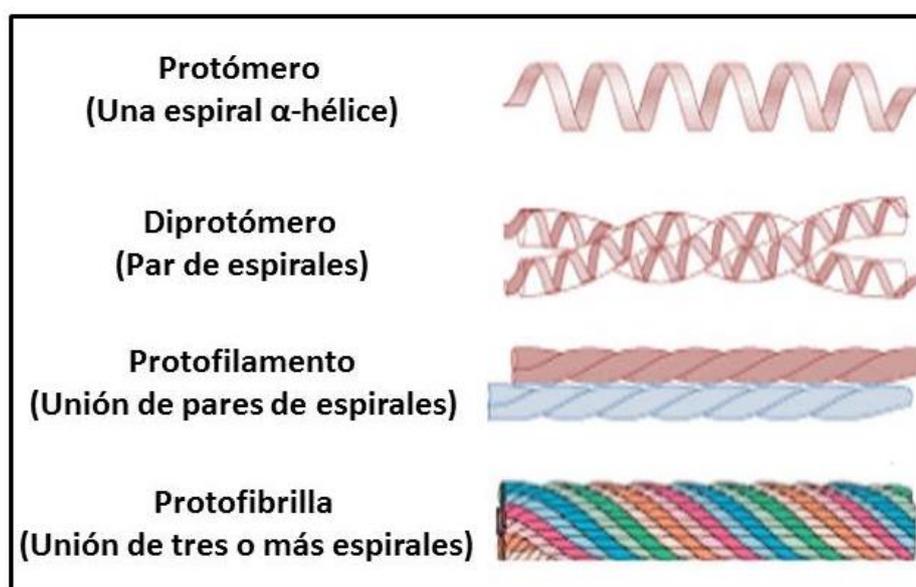


Figura 1.6 Estructura terciaria de la queratina (Salazar Cedeño, 2013).

1.3.3 Clasificación de las queratinas

Se pueden clasificar en función de la cantidad de enlaces disulfuro y su contenido de cistina en:

- Queratina suave: se caracteriza por tener pocos enlaces disulfuro, bajo contenido de cistina, son materiales blandos, flexibles y extensibles, se encuentran en la epidermis.

- Queratina dura: se caracteriza por tener muchos enlaces disulfuro, alto contenido de cistina, son materiales más rígidos y menos flexibles, se encuentran en estructuras como el pelo, las plumas, uñas, cuernos y tejidos de reptiles y aves.

Otra clasificación se basa en la prevalencia de estructuras secundarias α -hélice u hoja β -plegada:

- α -queratinas: se encuentran principalmente en los tejidos suaves de mamíferos como la lana, el cabello y la piel; su función es proporcionar estabilidad y estructura (Chen y col., 2012). Predomina la estructura **α -hélice**, están formadas por cadenas polipeptídicas α -helicoidales con alto contenido de cisteína y bajo contenido de prolina e hidroxiprolina (Sharma y Gupta, 2016). Las hélices se estabilizan por interacciones hidrofóbicas e interacciones iónicas, pero además su dureza y resistencia depende del número de enlaces cruzados disulfuro entre las distintas cadenas polipeptídicas. Presentan una masa molecular entre 40 – 68 kDa con un diámetro entre 7 – 10 nm (Sharma y Gupta, 2016).

- β -queratinas: están presentes en los tejidos rígidos como las uñas, cuernos, plumas, cascos. Predomina la estructura de **hoja β -plegada**, éstas permanecen unidas gracias a enlaces intercatenarios por puente de hidrógeno y por interacciones de Van Der Waals (Chen y col., 2012). Poseen aminoácidos con cadenas laterales relativamente pequeñas, por lo que son ricas en serina, glicina, alanina, lo que permite que las hojas se sitúen próximas y tienen bajos contenidos de cisteína, hidroxiprolina y prolina. Presentan una masa molecular entre 10 – 22 kDa con un diámetro entre 3 – 4 nm (Sharma y Gupta, 2016).

	α - queratinas	β -queratinas
Definición	Un tipo de proteína que se encuentra en mamíferos.	Proteína estructural que principalmente se presenta en mamíferos, aves y reptiles.
Función	Proporciona estructura y estabilidad.	Proporciona rigidez y protección.
Fuente	Lana, barbas, cabello, cuernos, uñas, cascos, corneas.	Plumas, picos de aves, garras y escamas de pangolín, epidermis de reptiles..
Características estructurales	Enlace de hidrógeno intramolecular.	Enlace de hidrógeno intramolecular.
	Matriz intermedia filamentosa.	Matriz amorfa.
	Masa molecular 40 – 68 KDa.	Masa molecular 10 – 22 KDa.
	7 – 10 nm de diámetro.	3 – 4 nm de diámetro.

Figura 1.7 Resumen comparativo de las características de 2 tipos de queratinas: α -queratinas y las β -queratinas.

1.3.4 Interacciones químicas de la queratina

La queratina presenta interacciones químicas como enlaces inter e intramoleculares entre moléculas polares y no polares que se dan entre los diferentes aminoácidos que la conforman, y enlaces disulfuro de cisteína intermoleculares. Estas interacciones le proporcionan propiedades exclusivas que la diferencian de otras proteínas (figura 1.8). Presenta **enlaces disulfuro** que se dan como la unión fuerte entre dos átomos de azufre de la molécula de cistina; en la molécula de α -queratina suele formar un puente de este tipo cada cuatro vueltas de la espiral (Salazar Cedillo, 2013). Otras interacciones presentes son los **puentes de hidrógeno**, estos se forman por la atracción de átomos de elementos electronegativos como el *Oxígeno*, *Nitrógeno* y *Flúor* con átomos de *hidrógeno* (polaridad positiva).

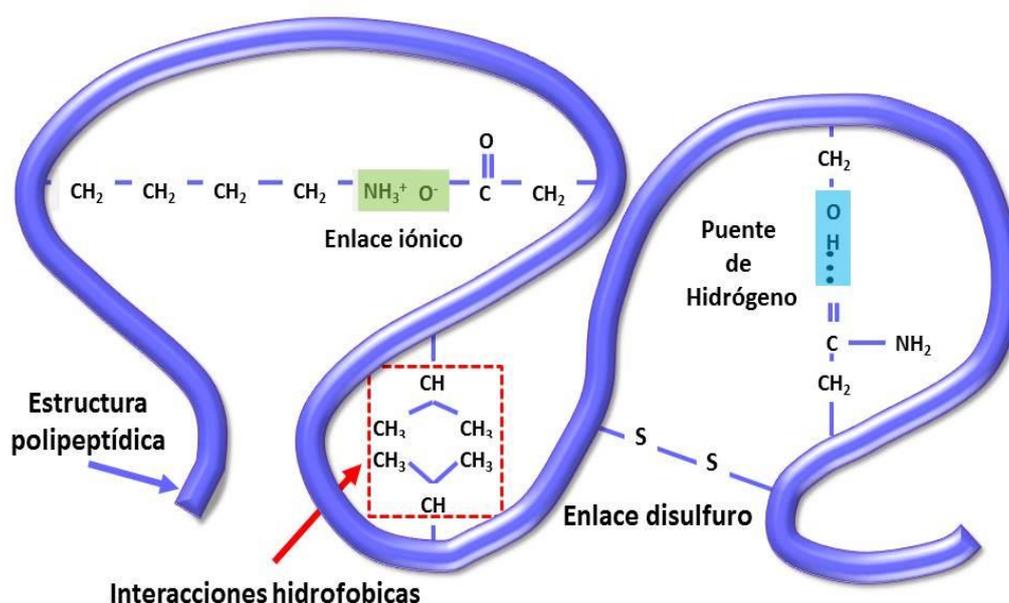


Figura 1.8 Diagrama de interacciones intra e intermoleculares en la queratina. Se presentan enlaces disulfuro, enlaces iónicos, puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas (Adaptado de Shavandi y col., 2017).

La presencia de este tipo de fuerza genera en las α -queratinas que las cadenas sean helicoides, girando sobre sí misma como una cinta enrollada. En las β -queratinas es una de las fuerzas que mantiene unidas las estructuras hoja β -plegada. Entre aminoácidos se dan enlaces amídicos que permiten formar la cadena principal. Cuando no se forman enlaces de este tipo, los grupos ácidos y básicos libres de las cadenas laterales que estén cerca uno del otro, pueden originar atracciones entre sus cargas dando lugar a la formación de puentes salinos (Salazar Cedillo, 2013).

1.3.5 Composición química de las queratinas

Estas proteínas están compuestas por un 15 - 18 % de nitrógeno, 2 - 5 % de sulfuro. Contiene entre 90 y 100 aminoácidos y 10,2 -10,4 kDa, 7 a 15 mol % de residuos de cisteína, la cual forma los enlaces S-S con otra cisteína (Arai y col., 1983) y forma cistina por enlaces disulfuro. La presencia de enlaces disulfuro, enlaces hidrofóbicos

y puentes de hidrógeno en la queratina proporciona su fuerza, estabilidad mecánica, rigidez, y resistencia a la degradación por enzimas proteolíticas (pepsina, tripsina y papaína).

El alto contenido de cistina es la característica inusual que diferencia a la queratina de otras proteínas como el colágeno. Los principales aminoácidos presentes en la queratina son: cistina, prolina, serina y glicina (Fraser y col., 1971).

1.3.6 Queratina de plumas de pollo

La queratina de plumas es una fuente potencial abundante, económica, amigable con el ambiente y comercial, tienen aproximadamente un peso molecular de 10,4 kDa (Schrooyen y col., 2001) y una densidad aproximada de 0,8 g/cm³ (Belarmino y col., 2012). La parte central es rica en residuos hidrofóbicos con una conformación estructural de hoja β -plegada. El empaquetamiento apretado de la cadena de queratina en forma de hoja β -plegada y las formas α -hélice da como resultado una estabilidad mecánica y una resistencia a la proteólisis y a enzimas digestivas tales como la tripsina y la pepsina. Esto es debido a la reticulación de las cadenas de proteínas por los mencionados puentes de cisteína, enlaces disulfuro e hidrógeno e interacciones iónicas.

1.4 Métodos usados para la producción de queratina

La obtención de las queratinas a partir de las diferentes biomásas implica al menos la escisión de los enlaces disulfuro (S-S), rompiendo las microfibrillas para proporcionar las moléculas de queratina separadas (Schrooyen y col., 2007). Diversas metodologías han sido aplicadas en la extracción de queratina de biomásas de plumas, entre las más utilizadas se encuentran los procesos de reducción que

incluyen el uso de tioles como el 2-mercaptoetanol y el Ditioneitol (DTT), sulfuro de sodio (Na_2S), procesos por sulfitolisis empleando sulfitos, bisulfito o disulfito, extracciones oxidativas mediante el uso de ácidos peracético o perácido, así como la hidrólisis alcalina con hidróxidos. En las tablas 1.2 a 1.4 se presentan algunas metodologías químicas aplicadas para la extracción de queratina.

Tabla 1.2 Métodos químicos de reducción para la extracción de queratina a partir de plumas de pollo.

Tipo de método	Descripción de la etapa de solubilización de plumas	Referencia
Reducción con Tioles	<ul style="list-style-type: none"> • Urea [7 M]; 2-mercaptoetanol (2-MEC); SDS pH neutro, t= 12 h	<i>Yamauchi y col., (1996)</i>
	<ul style="list-style-type: none"> • Urea [8 M]; 2-MEC [0,125 M] • Tris-HCL [0,25 M] pH= 7–9, T= 60 °C	<i>Schrooyen y col., (2000)</i>
	<ul style="list-style-type: none"> • 2-MEC; Ditioneitol (DTT) • T= 50 °C, t= 2 h 	<i>Sinkiewicz y col., (2016)</i>
Reducción con Sulfuro de sodio	<ul style="list-style-type: none"> • Na_2S 0,1 M T= 40-60 °C, t= 1 h	<i>Wrześniewska-Tosik y Adamiec, (2007)</i>
	<ul style="list-style-type: none"> • Na_2S [0,5 M] T= 30 °C; t= 6 h	<i>Gupta y col., (2012)</i>
	<ul style="list-style-type: none"> • Na_2S [500 mM] T=50 °C, t= 6 h	<i>Sharma y col., (2018)</i>
	<ul style="list-style-type: none"> • Na_2S [128 mM] T= 30°C, t= 1 h	<i>Poole y col., (2011)</i> <i>Poole y col., (2015)</i>
Reducción con L-cisteína	L-cisteína [1, 5, 10 y 20 %]; Urea [8 M]; NaOH para pH a 6,9 y 10.5 T= 70 °C, t= 24 h	<i>Xu y Yang, (2014a)</i>
	<ul style="list-style-type: none"> • L- cisteína [10 %]; Urea [8 M] pH > 10.5; T= 70 °C; t= 12 h	<i>Ma y col., (2016)</i>
	L- cisteína [0.165 M]; Na_2S [0,5 M]; Urea [8 M] <ul style="list-style-type: none"> • NaOH [2 M] para pH> 10.5 T= 40 °C; t= 6 h	<i>Pourjavaheri y col., (2019)</i>
	L- cisteína [10 %]; Urea [2 M]; SDS [10 %]; NaOH [15 %] para pH> 10.5 T= 70 °C; t= 12 h	<i>Mu y col., (2020)</i>

Tabla 1.3 Métodos químicos de sulfitolisis y oxidación para la extracción de queratina a partir de plumas de pollo.

Tipo de método	Descripción de la etapa de solubilización de plumas	Referencia
Sulfitolisis	Reactivos: <ul style="list-style-type: none"> • Urea [8 M]; • Metabisulfito de sodio [0,5 M] • SDS [0,2 M] T= 50 °C t= 2 h	<i>Sinkiewicz y col., (2017)</i>
	Reactivos: <ul style="list-style-type: none"> • Urea [8 M] • Bisulfito de sodio [0,5 M] • SDS [0.2 M] T= 50 °C t= 2 h	<i>Sinkiewicz y col., (2017)</i>
Sulfitolisis	Reactivos: <ul style="list-style-type: none"> • Urea [8 M]; • Metabisulfito de sodio [0,2 M] • SDS [0,6 M] • NaOH para un pH> 6.5 T= 65 °C t= 5 h	<i>Isarankura Na Ayutthaya y col., (2015)</i>
Oxidación	Reactivos: <ul style="list-style-type: none"> • H₂O₂ [0,5 M; 0,1 M; 0,2 M] T= 50 - 55 °C t= 2 h	<i>Borja Fernández-d'Arlas (2018)</i>

Tabla 1.4 Métodos químicos de hidrólisis para la extracción de queratina a partir de plumas de pollo.

Tipo de método	Descripción de la etapa de solubilización de plumas	Referencia
Hidrólisis con Hidróxido de Sodio	Reactivos: • NaOH [0,1 M] T= 90 °C t= 15 min	<i>Grewther y col., (1970)</i>
	Reactivos: • NaOH [5 % m/v] T= 40 °C t= 2 h	<i>Wrześniewska-Tosik y Adamiec, (2008)</i>
	Reactivos: • NaOH [1 N] T= 25 °C t= 25 h	<i>Song y col., (2013)</i>
	Reactivos: • NaOH [10 g/L] T= 120 °C t= 10 h	<i>Tsuda y Nomura (2014)</i>
	Reactivos: • NaOH [1 M] T= 90 °C t= 15 min	<i>Esparza y col., (2017)</i>

1.4.1 Otras metodologías de extracción de queratina

Entre los métodos más aplicados para la extracción de queratina a partir de diferentes biomásas, se encuentran los métodos enzimáticos, este ha sido reportado como método amigable con el ambiente y el operador, sin embargo, presenta bajos rendimientos y altos costos de implementación. Se ha reportado el uso de microorganismos que producen enzimas del tipo proteasas llamadas *queratinasas*, con la capacidad de degradar la cadena polipeptídica de la queratina. Algunas hidrólisis aplicando bacterias han sido investigadas, especialmente en la degradación

de materiales con alto contenido de β -queratinas como las plumas (Vines y col., 2019). Villa, y col., (2013) reportaron el uso de *Bacillus subtilis* AMR en el tratamiento de plumas para producir péptidos como ingredientes de productos capilares. A su vez algunas especies de actinomicetos y hongos degradan las queratinas de plumas de pollo mediante procesos enzimáticos (Ningthoujam y col., 2018).

Otro método de obtención reconocido como ecológico es el tratamiento hidrotérmico o explosión de vapor; este consiste en el uso de altas presiones de vapor saturado para calentar rápidamente la biomasa en reactores continuos o discontinuos (Vines y col., 2018). Las condiciones comunes de este método son temperaturas entre 180-230 °C y tiempos muy cortos que pueden variar de 1 a 10 minutos. Se han obtenido rendimientos de extracción de 62,5 % trabajando a 600 °C y 0,8 MPa (Ningthoujam y col., 2018).

El tratamiento por irradiación de microondas ha sido investigado como alternativa a los métodos químicos de extracción de queratina de lana (Zoccola y col., 2009). En el procesamiento de plumas para la obtención de polipéptidos se ha empleado este método en condiciones alcalinas, presentando los mejores rendimientos cuando se aplicó 800 W y una concentración de NaOH de 0,5 M durante 10 minutos (Lee y col., 2016). Para ambos casos, las estructuras desordenadas prevalecen sobre las estructuras hoja β -plegada.

Otro de los métodos aplicados es la extracción usando líquidos iónicos son compuestos salinos con características fisicoquímicas como baja presión de vapor, alta conductividad térmica, inflamable, alta solvatación y estabilidad térmica (Shavadi y col., 2017). Han sido reconocidos como solventes amigables con el ambiente (*Green solvents*) y son ampliamente usados en diversas actividades como la extracción de biomasa o en síntesis orgánicas, catálisis, electroquímica, entre otros. Es una

metodología más reciente aplicada en la extracción de queratina de plumas y lana; Xie y col., (2005) reportaron que el líquido iónico *Cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio* puede ser usado efectivamente en la extracción de queratina a partir de lana de ovejas, asimismo, este compuesto ha sido empleado como disolvente de plumas de pollo (Gupta y col., 2011). En estudios más recientes, se reportó la aplicación de *Cloruro 1-alilo-3-metilimidazolio*, *Cloruro 1-alil-3-metilimidazolio dicianamida*, *tioglicolato de colina* y *N, N-dimetil-2-aminoetanoil amonio formatato* en la extracción de queratina a partir de plumas de pollo. Sin embargo, la aplicación de esta metodología incide en altos costos de producción.

1.5 Aplicaciones

Queratina es el biopolímero de estructura proteica más abundante de origen animal, junto con el colágeno. Es un polímero natural que presenta una estructura de cadena polipeptídica, una estructura de matriz filamentosa, estructura laminar y una estructura emparedada que va desde la nano escala a la escala de centímetros. La naturaleza biodegradable y no toxica hace que sea versátil como biopolímero que puede ser modificado y usado en diferentes formas (geles, recubrimientos, films, grajeas y nano/micropartículas).

La queratina tiene aplicaciones en ciencias de alimentos, química verde, industria cosmética y farmacéutica.

1.5.1 Industria cosmética

La queratina hidrolizada ha sido ampliamente aplicada en la industria cosmética, esta no presenta efectos perjudiciales para la salud humana; se ha reportado el uso como componente de tratamientos para la piel, uñas y cabello como cremas, shampoos,

acondicionadores, removedores de esmaltes, entre otros. Su función es protectora de los factores mecánicos, químicos o ambientales. Para que la queratina pueda ser utilizada en compuestos cosméticos debe ser soluble (Lodén, 2009). La queratina más empleada para este tipo de aplicaciones es la de alto peso molecular, debido a su capacidad formadora de recubrimientos y su hidrofiliidad (Sharma y col., 2018). Mokrejs y col., (2017) desarrollaron hidrolizados de queratina aplicados en productos humectantes de la piel.

1.5.2 Industria farmacéutica y aplicaciones biomédicas

La queratina puede ser usada para obtener diferentes materiales con aplicaciones biomédicas debido a su biodegradabilidad y biocompatibilidad. Entre dichos materiales se encuentran las películas o recubrimientos, esponjas, hidrogeles y composites, utilizados en ingeniería de tejidos, regeneración ocular, tratamiento de heridas (Shavidi y col., 2017). Se han desarrollado películas de queratina e hidrogeles para usar en sistemas de liberación controlada de medicamentos (Poole y col., 2009; Yin y col., 2013) y reconstrucción ocular (Reichl y col., 2016).

Otras aplicaciones de los hidrogeles son parches hemostáticos (Aboushwareb y col., 2009), nano-carriers de agentes quimioterapéuticos (Curcio y col., 2015), tratamiento y recuperación de piel tras quemaduras (Burnett y col., 2013).

Debido a la capacidad auto-ensambladora de la queratina se pueden obtener estructuras tridimensionales (3D) como las esponjas, con diversas aplicaciones biomédicas como servir de superficie para la proliferación de células, protector de heridas contra infecciones debido a su poder antibacteriano, desarrollo y crecimiento de tejidos (Sharma y col., 2018).

1.5.3 Agronomía y Agroindustria

La queratina y sus derivados pueden ser utilizados por otros sectores diferentes al cosmético, farmacéutico y biomédico. Las aplicaciones en la industria alimentaria son incipientes, aunque es una proteína su perfil aminoacídico presenta bajo contenido nutricional. La queratina de plumas de pollo tras un proceso hidrolítico puede ser empleada en algunos casos como fuente de proteína en concentrados proteicos para alimentación de rumiantes (Coward-Kelly y col., (2006), Dalev y col., (1996, 1997). Sin embargo, como biopolímero presenta potenciales aplicaciones en el embalaje de alimentos. Las películas de queratina tienen mayor resistencia al agua que las películas a base de almidones ya ampliamente usadas en la industria, un ejemplo son las películas producidas por Ramírez y col., (2017) a partir de queratina de lana y ácido cítrico, con un buen efecto biocida y poca pérdida de queratina cuando se sumergen en agua.

Karthikeyan y col., (2007) reportaron como potencial aplicación de hidrolizados de queratina en la industria del cuero, ya que pueden mejorar el agotamiento del cromo durante el curtido a un 90 %, asimismo, pueden ser usados como agentes de curtido y relleno de superficies de cueros como el vientre y de poca sustancia sin incrementar la carga de los efluentes de la curtiembre. También se ha reportado la aplicación como biofertilizante debido a su alto contenido de nitrógeno y azufre (Kornilowicz-Kowalska y Bohacz, 2010).

1.5.4 Aplicaciones ambientales

La queratina presenta propiedades de sorción física y química, lo que la hace un material atractivo para ser usado como potencial biosorbente de diversos contaminantes. Se han empleado diferentes formatos como hidrogeles, microgeles,

criogeles, esponjas y nanofibras, de queratina con propiedades sorbentes se utilizan para sorber sustancias químicas como tintes, productos químicos y contaminantes orgánicos de soluciones acuosas para purificar agua contaminada con metales pesados (Tissera y col., 2020). Asimismo, pueden eliminar compuestos orgánicos volátiles (COV) y metales pesados como mercurio (Hg), cobre (Cu), plata (Ag), cadmio (Cd), plomo (Pb), aluminio (Al), arsénico (As), cobalto (Co) e hierro (Fe) del agua contaminada (Zhang y col, 2021; Ma y col., 2016).

Las esponjas de queratina son funcionales en el tratamiento de residuos líquidos o efluentes en la eliminación y recuperación de cromo en la industria del cuero. El mecanismo del proceso de adsorción y eliminación de contaminantes en el efluente está relacionado con la atracción electrostática y las propiedades termodinámicas (Hussain y col., 2020).

Otras aplicaciones involucran el uso de hidrogeles y nanopartículas de queratina para eliminar contaminantes emergentes como la ciprofloxacina (antibióticos) de los efluentes cuando se refuerzan con óxido de grafeno (Peralta Ramos y col., 2018).

Una de las aplicaciones más destacadas de la queratina en formato de esponjas es la utilización de ésta en derrames de hidrocarburos y petróleo. Zho y col., (2014), reportaron la obtención de esponjas de queratina a partir de plumas de pollo, las cuales presentaron muy buen desempeño en la sorción de derrames de aceites, con buena capacidad de retención del aceite captado.

En la tabla 1.3 se presentan varias aplicaciones de queratina y sus derivados.

Tabla 1.3 Aplicaciones de queratina y sus derivados en diferentes sectores industriales.

Sector industrial	Aplicación	Referencia
Cosmético	Hidrolizados de queratina para usos cosméticos.	<i>Mokrejs y col., (2017)</i>
Farmacéutica y aplicaciones biomédicas	Películas para sistemas de liberación controlada de medicamentos.	<i>Poole y col. (2009)</i> <i>Yin y col. (2013)</i>
	Hidrogeles en parches hemostáticos.	<i>Aboushwareb y col., (2009),</i>
	Tratamiento y recuperación de piel tras quemaduras.	<i>Burnet y col., (2013).</i>
	nano-carriers de agentes quimioterapéuticos	<i>Curcio y col., (2015)</i>
	Nanopartículas y macropartículas con aplicaciones farmacéuticas	<i>Xu y col. (2014b)</i> <i>Sundaram y col. (2015)</i> <i>Yu y col. (2014)</i> <i>Sharma y col. (2017)</i>
		Hidrogeles
	Aplicaciones en regeneración de tejidos	<i>Saravanan y col. (2013)</i> <i>Kumar y col. (2017)</i>
	Materiales	Esponjas de queratina para tratamiento de derrames de aceite.
Fibras regeneradas		<i>Xu y col. (2014b)</i>
Micro- y nanopartículas		<i>Sun y col. (2009)</i>
Fabricación de bio-composites.		<i>Flores-Hernández y col. (2014)</i> <i>Spiridon y col., (2012)</i> <i>Huda y Yang (2008, 2009)</i>
Películas y termoplásticos		<i>Reddy y col. (2013),</i> <i>Jin y col. (2011)</i>

Agronomía y Agroindustria	Manejo de residuos mediante degradación microbiana.	<i>Vasileva-Tonkova y col., (2009), Syed y col. (2009), Grazziotin y col. (2006)</i>
	Biofertilizantes	<i>Kornillowicz-Kowalska y Bohacz (2010) Gurav y Jadhav (2013) Hadas y Kautsky (1994) Gousterova y col. (2012)</i>
	Suplemento dietario para rumiantes.	<i>Coward-Kelly y col. (2006), Dalev y col., (1994), (1996), (1997)</i>
	Procesamiento de cuero.	<i>Sastry y col. (1986) Sehgal y col. (1986) Karthikeyan y col. (2007)</i>
	Procesamiento textil.	<i>Reddy y col. (2014) Yang y Reddy (2013) Reddy y Yang (2007)</i>
	Queratinas en formulaciones de detergentes.	<i>Balakumar y col. (2013) Manivasagan y col., (2014)</i>
	Retardante de fuego	<i>Wang y col. (2014)</i>
Ambientales	Esponjas para la captación de aceite.	<i>Zhoe y col., (2014)</i>
	Tratamiento de aguas contaminadas con metales pesados	<i>Zhang y col, 2021 Ma y col., 2016</i>

1.6 Planteamiento del problema

La biomasa de plumas de pollo es una fuente abundante, económica y disponible para ser aprovechada en la obtención de queratina; mediante metodologías de reducción e hidrólisis se puede transformar el residuo en biomateriales de distintos formatos como esponjas, matrices porosas y películas.

El uso de reactivos eco-compatibles y económicos son una alternativa a los tradicionalmente aplicados, además el reemplazo de la etapa de diálisis por etapas de lavados y centrifugados conducen a un proceso de obtención de queratina escalable a nivel industrial.

Los biomateriales a base de queratina pueden ser utilizados como agentes sorbentes de contaminantes industriales; su composición química y microestructura permiten captar y retener hidrocarburos y aceites siendo apto para el control de derrames en suelo y en agua.

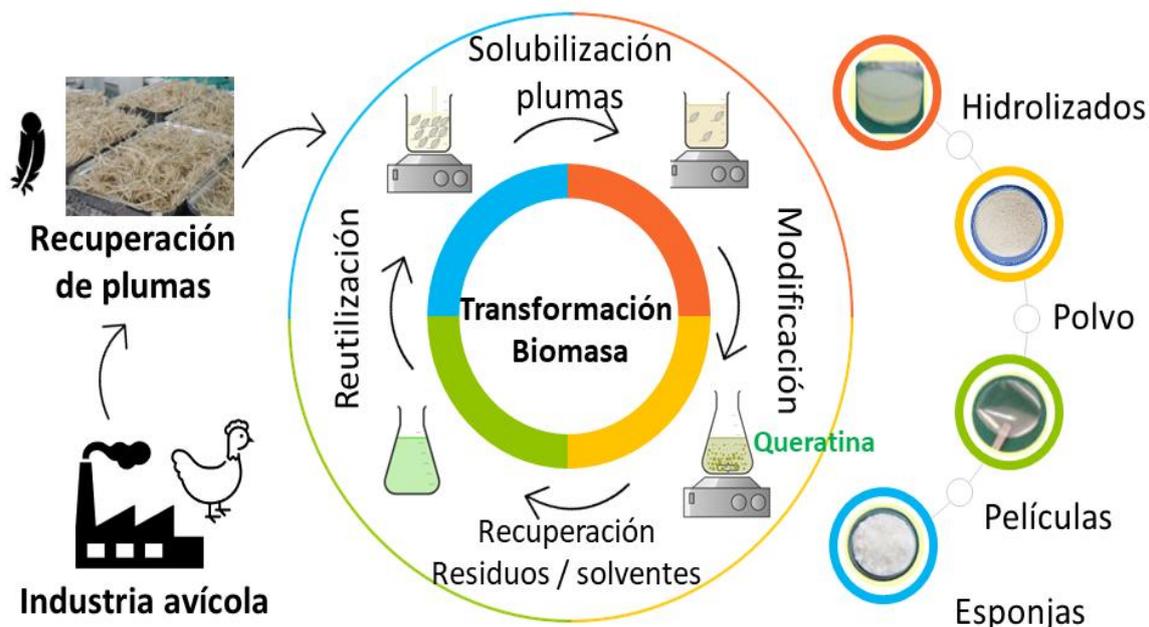


Figura 1.9 Esquema del proceso de aprovechamiento y reutilización de plumas de pollo, residuos de la industria avícola.

1.7 Justificación general

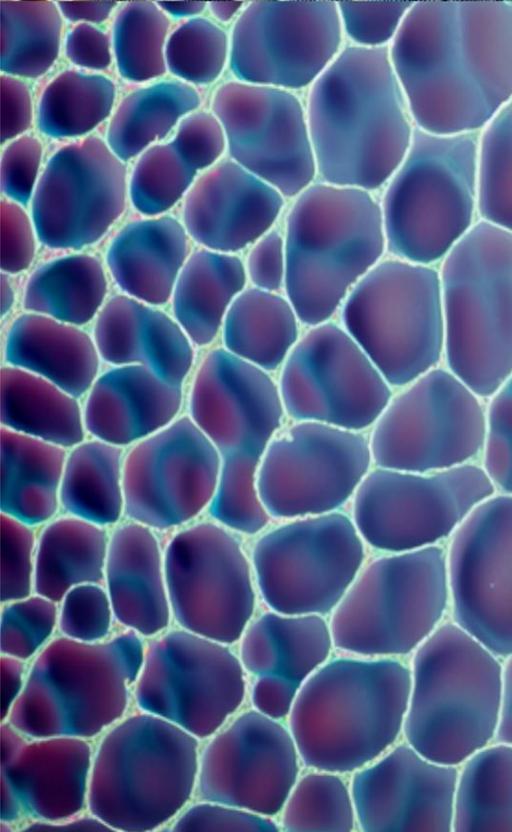
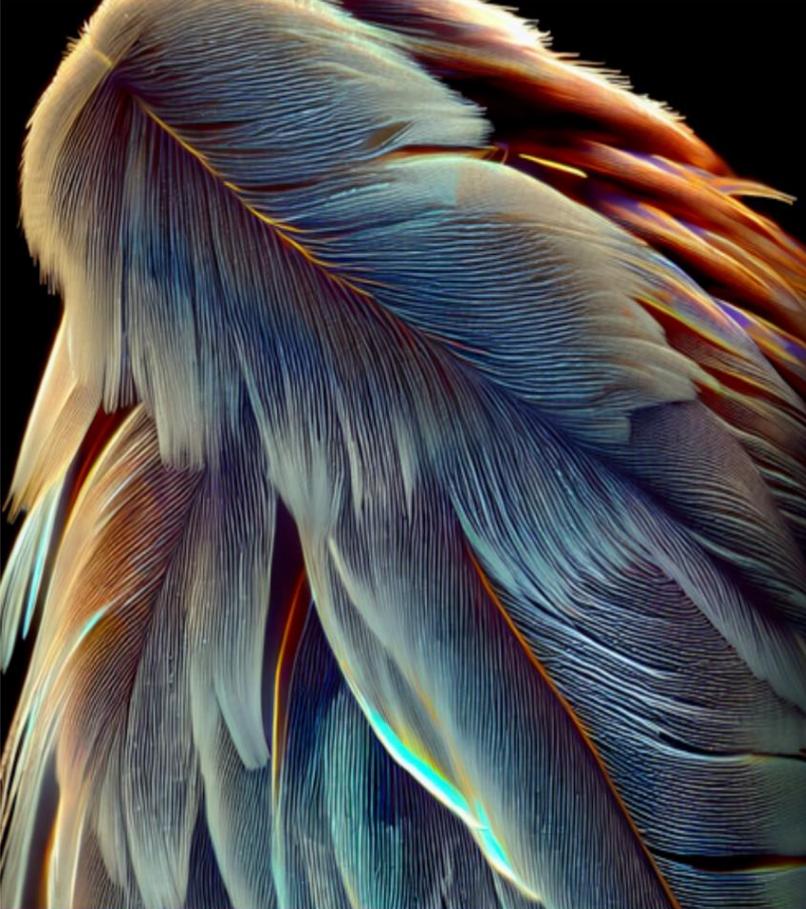
El aprovechamiento de residuos industriales para generar productos de mayor valor agregado con aplicaciones tecnológicas constituye un tema de gran interés. Argentina por sus niveles de producción de carne de aves es uno de los principales generadores de biomasa de plumas a nivel internacional; se caracterizan por ser de difícil degradación y cuya disposición final representa un importante problema ambiental. Las plumas de pollo podrían revalorizarse, utilizándolo como materia prima para la obtención de diferentes productos a base de queratina con mayor valor agregado, tales como, películas, esponjas, hidrogeles, entre otros, con potencial aplicación en diversas industrias principalmente en las industrias alimentaria, agrícola, biomédica, farmacéutica y cosmética. Si bien a nivel mundial el aprovechamiento de residuos queratinosos (lana, plumas, cascos, pelo, etc.) presenta casos exitosos de vinculación y transferencia científico-industrial, en Argentina no se reporta actividad productiva concerniente a la transformación de estos residuos con miras a la obtención de la proteína y generación de nuevos materiales. Surgiendo en este panorama la necesidad de proponer y diseñar alternativas tecnológicas para el aprovechamiento de residuos de la industria avícola en la obtención de queratina y biomateriales, productos derivados con mayor valor agregado, mitigando los efectos negativos a nivel ambiental que pueden generar de dichos residuos.

1.8 Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo de tesis surge de la necesidad de aplicación de nuevas tecnologías alternativas para el aprovechamiento de residuos de la industria avícola, contribuyendo a la disminución de la contaminación ambiental causada por la biomasa y su manejo convencional.

Se plantea desarrollar metodologías alternativas eficientes y económicas para la obtención de queratina a partir de plumas de pollo, que empleen reactivos menos contaminantes/tóxicos, con menos efectos nocivos para el manipulador y el medio ambiente; además tratando de eliminar las etapas que elevan los costos del proceso industrial, como la diálisis y permitir el escalado industrial de este proceso. Se buscará optimizar las condiciones (temperatura, tiempo de reacción, concentración de los reactivos, etc.) de los diferentes procesos de obtención a los efectos de aumentar los rendimientos. También se propone la síntesis de biomateriales en formato de esponjas a partir del biopolímero para utilizar como material sorbente en el control de derrames de crudo y aceite.

TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN



CAPITULO II

En el presente capítulo se presentan los fundamentos de las principales técnicas y metodologías empleadas para caracterizar las plumas de pollo y los productos de queratina obtenidos.

2.1. Adecuación de plumas de pollo

Se utilizaron plumas de pollos parrilleros de 49 días promedio de faena, líneas COBB y ROSS producidos por reproductoras pesadas, las cuales fueron provistas por Domvil SA - Frigorífico Aveguay de Entre Ríos, Argentina.

Las plumas de pollo se recibieron congeladas e inmediatamente se procedió a su adecuación. En una primera etapa, se realizaron lavados consecutivos con agua corriente a 40 °C y detergente común con agitación constante, retirando el material extraño como palos, piedras, restos de tejidos, picos, fibras, etc. Posteriormente, se realizó un último lavado con una mezcla de agua destilada-etanol 96 % (50:50) con el fin de retirar cualquier residuo de detergente. Las plumas lavadas se filtraron y escurrieron retirando la mayor cantidad de agua posible; luego se distribuyeron en bandejas de aluminio y se secaron en estufa por 24 h a 30 °C.

En una segunda etapa las plumas se cortaron y molieron en un molino ciclón y se desengrasaron usando 100 mL de éter de petróleo (Anedra) por cada 10 g de pluma seca, por un tiempo de 4 h con agitación constante. Se filtró y removió el exceso de solvente y las plumas se secaron bajo campana a temperatura ambiente por 2 h y luego en estufa a 30 °C por 24 h. El solvente se recuperó posteriormente en un rotavapor a 40 °C. Finalmente, las plumas acondicionadas fueron empacadas en sobres de papel aluminio y almacenadas a 20 °C hasta el proceso de extracción.

El procedimiento usado para la adecuación de las plumas de pollo se muestra en la Figura 2.1.

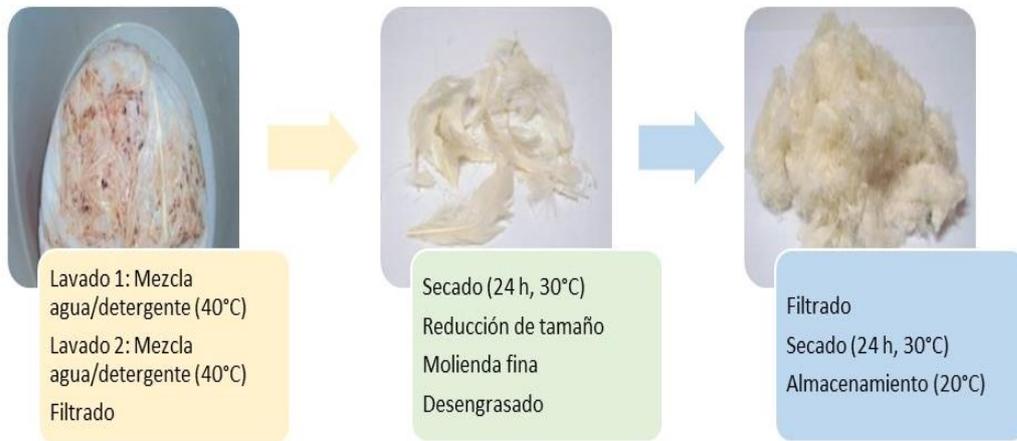


Figura 2.1. Etapas del proceso de acondicionamiento de las plumas de pollo.

2.1.1 Fraccionamiento de las plumas

Con el fin de comprobar la heterogeneidad del material de partida las plumas se dividieron manualmente en las barbas (B), el calamus (C) y el raquis (R) (Figura 2.2). Cada parte de la pluma se adecuó según el procedimiento anteriormente descrito (Figura 2.1).



Figura 2.2. Partes de la pluma de pollo: Barbas, Calamus y Raquis adecuados.

2.2 Caracterización de las plumas de pollo

2.2.1 Humedad

El contenido de humedad de las plumas de pollo previamente adecuadas se determinó mediante el método gravimétrico. Las plumas se secaron a 105 ± 1 °C hasta alcanzar peso constante en una estufa Sanjor serie SL DB (Buenos Aires, Argentina). Todas las determinaciones se hicieron por triplicado. El porcentaje de humedad (H (%)) se calculó mediante la ecuación (2.1):

$$H(\%) = [(m_i - m_f) / m_i] * 100 \quad (\text{Ec. 2.1})$$

donde, m_i es la masa de las plumas previo al secado (g) y m_f es la masa seca final (g).

2.2.2 Determinación del contenido de cenizas

El contenido de cenizas se determinó por diferencia de peso después de la combustión de la biomasa en una mufla. Se pesaron $0,1 \pm 0,01$ g de las plumas de pollo secas y desengrasadas, se dispusieron en una cápsula de porcelana previamente secada y tarada. Se procedió a calcinar la muestra sobre un mechero de triángulo con malla de amianto; posteriormente, la muestra calcinada se llevó a la mufla por 12 h a 650 °C hasta alcanzar cenizas blancas. El contenido de cenizas fue calculado según la ecuación 2.2, en relación con la masa original de plumas en base seca y la masa remanente tras el proceso de combustión.

$$\text{Cenizas } (\%) = [(m_i - m_c) / m_i] * 100 \quad (\text{Ec. 2.2})$$

donde, m_i es la masa de las plumas previo al secado (g) y m_c es masa seca final del proceso de combustión (g).

2.2.3 Determinación del contenido de proteína cruda

El contenido de proteína cruda (total) de las plumas de pollo se determinó por el método de Kjeldahl (AOAC 991.20; 2010); este método cuantifica el nitrógeno total que proviene principalmente de las proteínas y usando un factor de conversión se puede determinar el contenido total en la muestra analizada.

Procedimiento:

Etapa de digestión: A una masa de $0,1 \pm 0,01$ g de plumas previamente acondicionadas se agregaron 5 g de mezcla catalizadora (*sulfato de potasio anhidro* (K_2SO_4) y *sulfato de cobre pentahidratado* ($Cu_2SO_4 \cdot 5H_2O$) en relación másica de 10:1) y 15 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) en un digestor BÜCHI (K-435, Suiza).

Etapa de destilación: la muestra digerida se traslada a un destilador semiautomático (BÜCHI K-350, Suiza), donde se le adiciona 15 mL de agua destilada y 15 mL de NaOH 32 % (m/v) hasta alcalinidad neta, para proceder a liberar el amonio (NH_4^+) en forma de amoníaco (NH_3). El NH_3 se destiló por arrastre de vapor de agua y se recolectó en 50 mL de ácido bórico (H_3BO_3 ; 4 % m/v) en presencia de indicador de Mortimer (rojo de metilo y verde de bromocresol). La destilación se realizó hasta que la solución viró al verde azul y se tituló con ácido clorhídrico (HCl) 0,1016 N previamente valorado hasta que el color viró a un rojizo claro inicial. Se realizó un blanco para evaluar la posible presencia de compuestos nitrogenados en los reactivos empleados.

El porcentaje de Nitrógeno se calculó empleando la ecuación 2.3:

$$\%Nitrógeno\ total = \frac{(Vm - Vb) * N * 0.014}{m} * 100 \quad (\text{Ec. 2.3})$$

donde, V_m es el volumen de ácido gastado para valorar la muestra (mL), V_b el volumen de ácido gastado para valorar el blanco (mL); N es la normalidad del ácido, 0,014 es el peso de un m_{eq} de Nitrógeno, m es la masa de la muestra (g).

Para la determinación del porcentaje de proteína cruda (% p/p) a partir del de nitrógeno total (% m/m, Ec. 2.3) se requiere un factor de conversión empírico, $F_{N \rightarrow P}$ (Ec. 2.4). Para las plumas y sus derivados utilizamos $F_{N \rightarrow P} = 6,25$.

$$\% \text{ Proteína total} = \%N \text{ total} * F_{N \rightarrow P} \quad \text{(Ec. 2.4)}$$

2.2.4 Determinación de proteína soluble

Se usó el método colorimétrico para determinación de proteínas de Biuret, el cual se basa en la formación de un complejo coloreado entre el Cu^{2+} y los grupos -NH de los enlaces peptídicos en medio básico. Un catión Cu^{2+} se acompleja con cuatro grupos -NH (Figura 2.3), dando como resultado el complejo *Cu-Proteína* de coloración violeta. La intensidad de coloración es directamente proporcional a la cantidad de enlaces peptídicos, por ende, a la concentración de proteína de la muestra estudiada. La reacción es bastante específica, de manera que pocas sustancias interfieren.

El reactivo de Biuret se preparó disolviendo 1,5 g de sulfato de cobre pentahidratado ($CUSO_4 \cdot 5H_2O$) y 6 g de tartrato de sodio y potasio ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$) en 500 mL de una solución de hidróxido de sodio (NaOH; [10 %m/v]).



Figura 2.3. Reacción del reactivo de Biuret en medio básico, formación del complejo violeta Cu-Proteína.

Se construyó la curva de calibración a partir de las absorbancias medidas para concentraciones conocidas de proteína patrón en el rango de 0 a 2,0 mg/mL. El estándar de proteína se preparó diluyendo 10 mg/mL de albúmina Sigma Aldrich en el solvente de obtención del producto derivado de queratina.

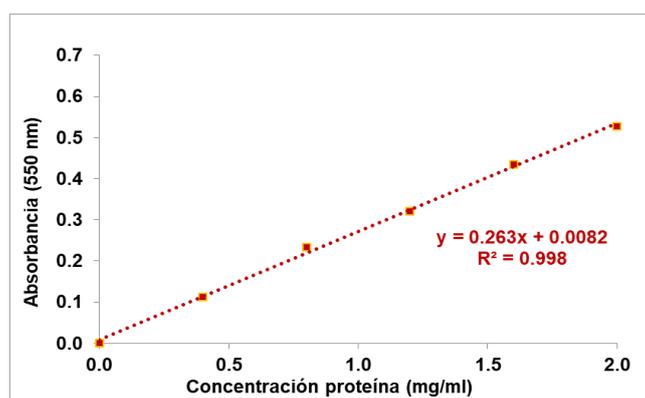


Figura 2.4. Curva de calibración Reactivo de Biuret; Patrón Albúmina.

Para la reacción con los derivados de queratina, se centrifugaron 1 mL de muestra durante 10 min a 13000 rpm y 25 °C en una microcentrífuga (5415D Benchtop, Eppendorf). Se tomó 0,3 mL del sobrenadante y se traspasó a un tubo de ensayo al cual se adicionó 0,2 mL de agua destilada y 2 mL del Reactivo de Biuret (NaOH [10 % m/v]). La reacción se agitó en vortex por 10 s cada tubo y se incubó a 25 °C durante 30 minutos. La absorbancia se leyó en un espectrofotómetro UV mini-1240 UV-Vis (Shimadzu Scientific Instruments, Japón) a una longitud de onda $\lambda = 550$ nm.

2.2.5 Determinación de turbidez

La turbidez se refiere a la reducción de la transparencia de una sustancia o mezcla líquida debido a la presencia de partículas en dispersión. Está fundamentada en la relación entre la intensidad de la luz incidente y la luz dispersada por el medio mediante la ley de Lambert-Beer, en la que la turbidez es proporcional a la concentración de partículas (Acebo-González y Hernández-García, 2013).

La estabilidad de los derivados de queratina soluble se siguió a través de la formación de agregados proteicos utilizando la medida de turbidez. Para determinar la turbidez de los derivados solubles de queratina obtenidos, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm en cubetas de vidrio de 1 cm de paso óptico (c) en un espectrofotómetro UVmini-1240 UV-Vis (Shimadzu Scientific Instruments, Japón), según el procedimiento experimental propuesto por Tonin y col. (2010).

La turbidez (τ) se puede calcular midiendo la transmitancia (T) a 540 nm mediante la ecuación 2.5 (Tonin y col., (2010):

$$\tau = -(\ln T)/b \quad (\text{Ec. 2.5})$$

Donde b es la longitud del paso óptico (1 cm).

Como la absorbancia (Abs) se relaciona con la Transmitancia (T) mediante la expresión $\text{Abs} = -\log T$, la absorbancia es proporcional a la turbidez.

2.2.6 Grado de modificación (Determinación de sulfhidrilos):

El grado de modificación para los derivados de queratina se determinó mediante el ensayo de DTNB (Reactivo de Ellman: 5,5'-ditio-bis ácido 2-nitrobenzoico). En la reacción de reducción del reactivo de Ellman (Figura 2.5), el DTNB reacciona

con un grupo sulfhidrilo libre para producir una mezcla de un disulfuro mixto y TNB (ácido 2-nitro-5-tiobenzoico); el TNB es una especie libre coloreada que presenta un alto coeficiente de extinción molar en el rango visible.

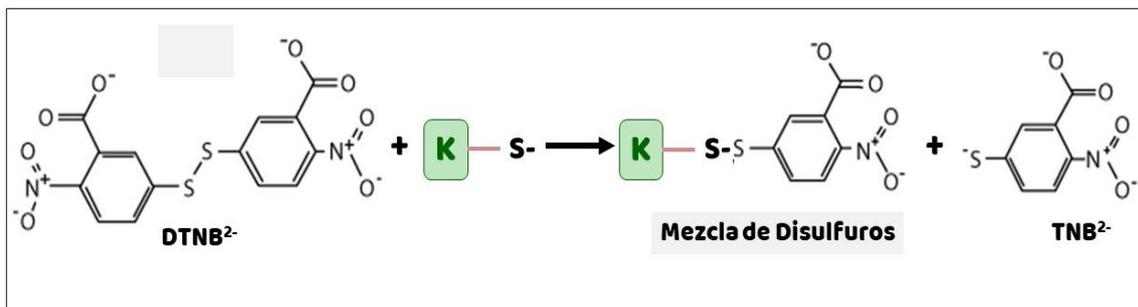


Figura 2.5. Reacción de reducción del reactivo de Ellman en presencia de grupos sulfhidrilos libres.

Con esta determinación se comparó el contenido de grupos libres -SH remanentes tras la modificación (incluyendo la cantidad de enlaces disulfuro presentes) con el contenido de -SH (incluyendo la cantidad de enlaces disulfuro) previo a la modificación. El contenido teórico de grupos -SH y enlaces disulfuro en queratina nativa (basado en la cantidad de residuos presentes de cistina/cisteína) es cerca de 700 μmol grupos cisteína/g queratina (Schrooyen y col., 2001).

Se tomó una alícuota de 100 μL de cada muestra y se les adicionó 2,4 mL de una solución que contenía 8 M de urea, 50 mM Tris, 3 mM EDTA y 10 mM de DTNB a pH a 8,0. Posteriormente se midió la absorbancia a una longitud de onda $\lambda = 412 \text{ nm}$ en un espectrofotómetro UVmini-1240 UV-Vis (Shimadzu Scientific Instruments, Japón).

La determinación del contenido de sulfhidrilos libres se realizó calculando la concentración molar a partir de la ecuación de Lambert simplificada de la Ley de Lambert- Beer (Ec. 2.6):

$$A = \varepsilon . c . b \quad (\text{Ec. 2.6})$$

donde, **A** es la absorbancia medida de la muestra, **c** es la concentración molar (mol/L), **b** el camino óptico medido en cm y **ε** es el coeficiente de extinción molar teórico de 13600 M⁻¹cm⁻¹ (Schrooyen y col., 2000).

El grado de modificación se calculó usando la ecuación 2.7:

$$\%Mod = 100 * (C_{SS} - C_{SSmod})/C_{SS} \quad (\text{Ec. 2.7})$$

donde, C_{SS} es el contenido de enlaces disulfuro presentes en la muestra sin modificar y C_{SSmod} es el contenido de enlaces disulfuro presentes en la muestra tras la modificación química aplicada.

2.2.7 Liofilización de la queratina

Para la obtención de la queratina en polvo y biomateriales a partir de queratina se incluyó la etapa de secado por liofilización; es un método de deshidratación que involucra la congelación del agua presente en el material, seguido de la deshidratación por sublimación del hielo minimizando las reacciones de deterioro como consecuencia de la reducción de la actividad acuosa. Las bajas temperaturas del proceso menores a la temperatura ambiente permiten obtener productos termolábiles (propensos a cambios de estructura, textura) con un daño mínimo (Barbosa-Cánovas y col., 2000). El proceso consta de 3 etapas principales (Figura 2.6), partiendo de la **congelación** de los materiales que se realiza por debajo de la temperatura de solidificación, formando los cristales de hielo, seguido de la etapa de **secado primario** en donde las moléculas subliman y pasan a la fase vapor, disminuyendo la temperatura del producto congelado. Durante esta etapa el secado es rápido y se consume gran cantidad de calor

latente de sublimación durante el cambio de estado, generando una capa porosa. El proceso finaliza con el **secado secundario** donde el agua parcialmente ligada al material es removida por desorción. El producto debe mantenerse a temperaturas por debajo de los 30 °C para evitar el colapso, proteger la composición y mantener sus características texturales.

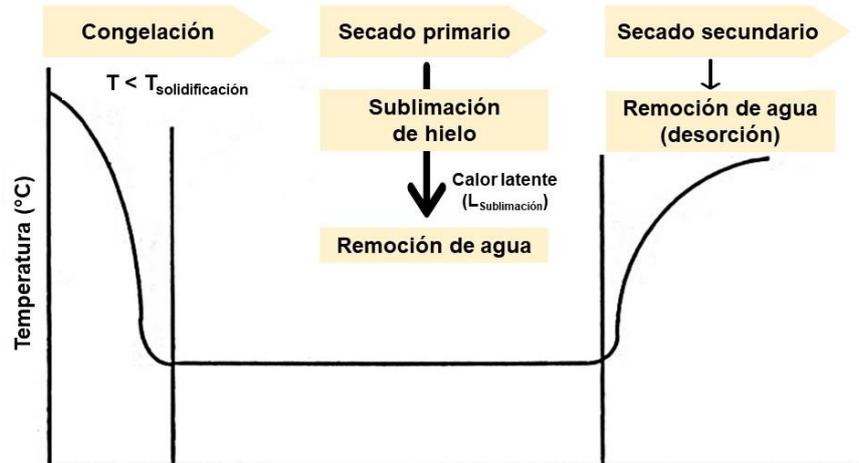


Figura 2.6. Etapas del proceso de liofilización (Adaptado de Barbosa-Cánovas y col., 2000).

2.3 Metodologías de caracterización aplicadas a los productos derivados de queratina

2.3.1 Evaluación del peso molecular de los derivados solubles de queratina mediante electroforesis

La electroforesis SDS-PAGE es un método de separación de proteínas útil para la visualización y separación de preparaciones de proteínas en pequeña escala; permite la determinación experimental de propiedades como el punto isoelectrico y el peso molecular (PM) de una proteína.

Se define como el movimiento de partículas cargadas en un campo eléctrico, la velocidad de migración dependerá de la intensidad del campo, la carga neta, tamaño y forma de las moléculas, es decir, las proteínas con mayor peso

molecular migran más lento que las de menor peso molecular. Otros factores como la fuerza iónica, viscosidad y temperatura pueden influir en la velocidad de movimiento de proteínas.

El peso molecular de los derivados de queratina obtenidos se evaluó mediante el protocolo de electroforesis en gel de Tricina/SDS-PAGE de acuerdo con el protocolo de Schagger y Jagow (1987).

La queratina se incubó a 100 °C durante 3 min en un buffer que contenía 50 mM Tris, de SDS 4 %, de glicerol 12 % (m/v), colorante Serva blue G (0,01 %) y en condiciones reductoras adicionando 1 % de DTT.

Se usaron patrones de bajo peso molecular (LMW) GE Health Care contiene 6 referencias: fosforilasa b (97 kDa), seroalbúmina bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de tripsina (20,1 kDa) y α -lacto albúmina (14,4 kDa). También se usaron patrones de ultrabajo peso molecular (ULMW) marca BIO-RAD que incluye triosa-fosfato isomerasa (26,6 kDa), mioglobina (16,95 kDa), α -lacto albúmina (14,4 kDa), aprotinina (6,51 kDa), cadena β de la insulina (3,5 kDa) y bacitracina (1,4 kDa).

La electroforesis se llevó a cabo en un gel discontinuo de poliacrilamida, con un gel espaciador (stacking) de 4 % y gel (spacer) 10 % y de separación de 16 %; la electroforesis se inició a 30 V y 30 mA hasta pasar el gel espaciador (stacking), luego se mantuvo constante a 90 V. Para la fijación de las proteínas se usó una solución de metanol 50 % (v/v) y ácido acético 10 % (v/v), durante 30 min. Luego, las proteínas en el gel fueron coloreadas con una solución de azul de Coomassie R-250 0,1 % en 30 % (v/v) metanol y 10 % (v/v) de ácido acético durante 12 h.

Finalmente, los geles se decoloraron con una solución de 10 % ácido acético y 30 % metanol por 30 min, seguido de varias inmersiones en metanol 15 % y ácido acético al 5 %.

2.3.2 Isotermas de sorción

Las características de sorción de productos agroindustriales juegan un importante rol en procesos tecnológicos como el secado, manipulación, empaque/embalado, almacenamiento, mezclado, secado por liofilización y estimación de las condiciones de deterioro. Las isotermas de sorción de agua son herramientas termodinámicas importantes para predecir las interacciones entre el agua y los componentes de la matriz; describen la relación entre la actividad acuosa (a_w) y el contenido de humedad de equilibrio de la matriz (W_c). Son útiles en el cálculo de las energías de sorción y proporcionan información útil para operaciones como el secado, envasado y almacenamiento (Lomauro y col., 1985). Pueden ser de dos tipos (Figura 2.7.A): las isotermas de sorción se obtienen exponiendo un material seco a varias atmósferas de creciente humedad relativa y midiendo la ganancia de peso debido a la adsorción de agua; en las isotermas de desorción se parte de un material húmedo, se lo expone a humedades relativas decrecientes y se va registrando la pérdida de peso (Al-Muhtaseb y col., 2002).

Estos procesos no son completamente reversibles y pueden tomar caminos diferentes, es decir, para un contenido de humedad determinado el valor de actividad acuosa es menor para la desorción que para la adsorción, este fenómeno recibe el nombre de histéresis (Fennema, 2000).

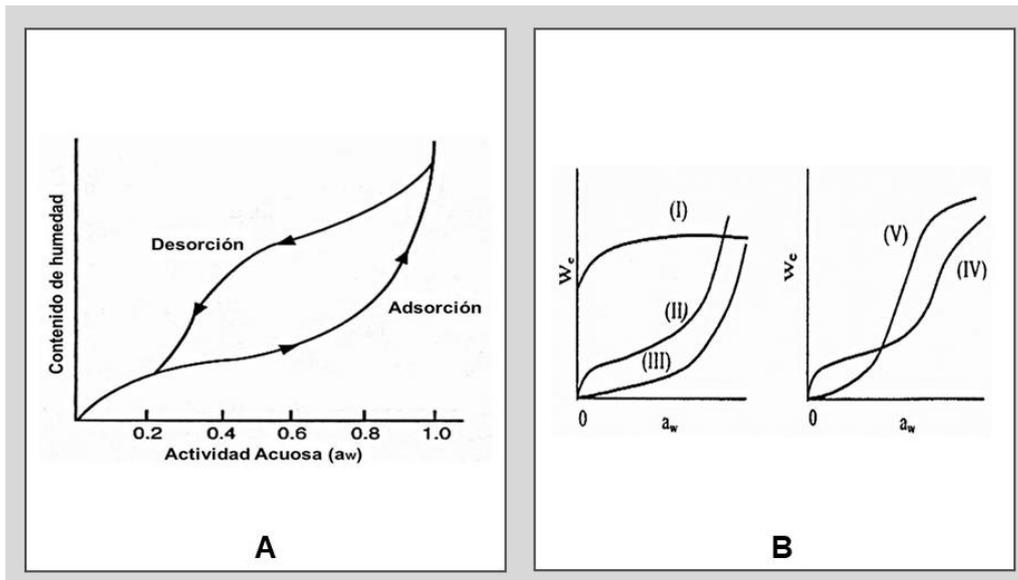


Figura 2.7 A) Isotherma de sorción generalizada (Adaptado de Al-Muhtaseb y col., 2002). **B)** Tipos de Isotherma de sorción (Al-Muhtaseb y col., 2002).

Las isothermas de sorción pueden ser divididas en tres zonas (Fennema, 2000):

a) *Zona de monocapa (I)*: donde se presenta la máxima velocidad de oxidación de lípidos ($a_w = 0-0,2$). El agua presente en esta zona es la más fuertemente sorbida y la de menor movilidad (agua ligada). Se comporta como parte integrante del sólido.

En el límite entre las zonas I y II corresponde al contenido de humedad de la “monocapa de BET”, corresponde aproximadamente a la cantidad de agua necesaria para formar una monocapa sobre los grupos altamente polares y accesibles de la materia seca.

b) *Zona multicapa (II)*: Se presentan interacciones agua-agua y agua-sólido. El agua añadida ocupa sitios de la primera capa que aún permanecen libres. El agua añadida en el límite de I y II ejerce una significativa acción

plastificante, asociada con el comienzo del proceso de solubilización y el aumento en la velocidad de la mayoría de las reacciones de deterioro.

- c) *Zona (III)*: Aparición del agua libre $a_w \geq 0,8$, tiene capacidad solvente y es fácilmente utilizable por los microorganismos para su actividad biológica, crecimiento y multiplicación.

2.3.3 Análisis del comportamiento térmico de las plumas de pollo y los derivados de queratina por Calorimetría Diferencial de Barrido

La técnica de calorimetría Diferencial de Barrido (DSC; Differential Scanning Calorimetry) se basa en la medición de la capacidad calorífica relativa de un sistema determinado cuando este sufre una transición inducida debido a un cambio térmico aplicado (Beldarraín, 2001).

La técnica consiste en calentar o enfriar a la misma velocidad y de manera simultánea una cápsula que contiene la muestra enfrentada a una cápsula de referencia vacía. Al calentar la muestra se produce una transición inducida por la temperatura que absorbe parte del calor suministrado, por lo tanto, la temperatura de la muestra será menor que la de la cápsula referencia. Con el fin de mantener las temperaturas constantes, el sistema suministra una potencia de calentamiento adicional proporcional a la diferencia de capacidades caloríficas entre la muestra y la referencia (Figura 2.8).

En el caso de las proteínas se puede analizar el estado nativo (N) o desnaturalizado (D) mediante los cambios en la energía involucrada en las transiciones de plegamiento-desplegamiento de las proteínas mediante sus cambios conformacionales a causa de la temperatura.

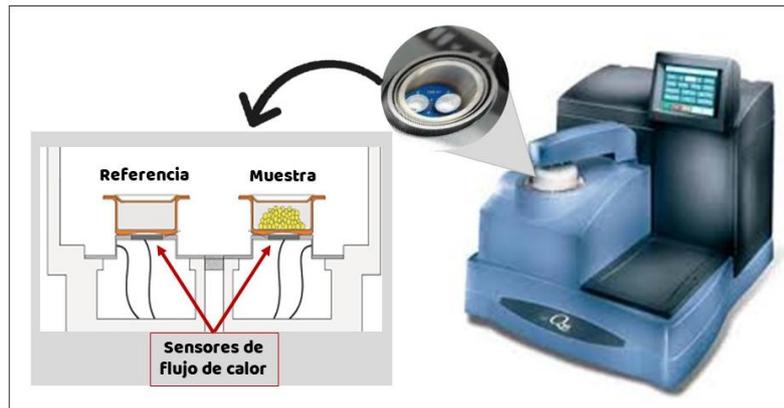


Figura 2.8. Calorímetro diferencial de Barrido Q-100 (TA Instrument) y esquema del interior del horno.

En la figura 2.9 se muestra un termograma obtenido en el DSC que representa el flujo de calor vs temperatura para las diferentes partes que conforman las plumas de pollo (Takahashi y col., 2014), donde se evidencian los picos endotérmicos correspondientes a la desnaturalización. La temperatura en el máximo del pico (T_p) coincide con la temperatura a la que se produce la transición térmica de desnaturalización proteica.

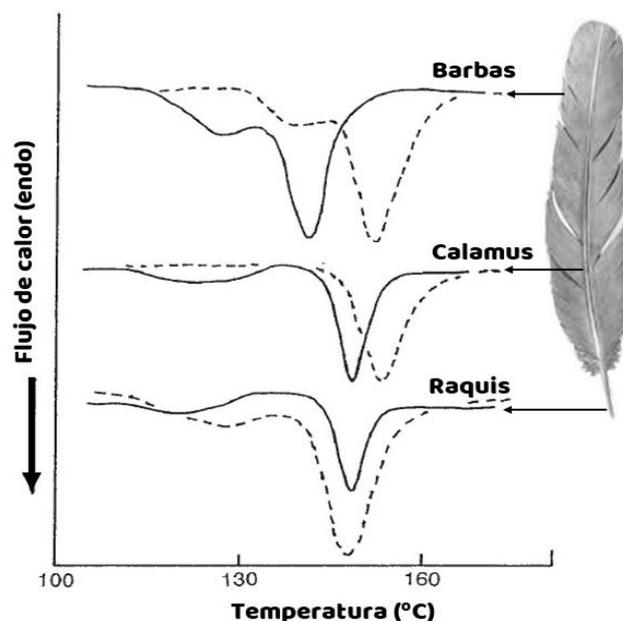


Figura 2.9. Termograma de las fracciones de la pluma de pollo; Barbas, Calamus y Raquis (— muestra nativa; - - - muestra pulverizada) (Adaptado de Takahashi y col., 2014).

En el presente trabajo de tesis se analizó el comportamiento térmico de las plumas de pollo y sus fracciones (Barbas, Calamus y Raquis) y de los derivados de queratina obtenidos a partir de las metodologías de solubilización. Las determinaciones se realizaron en un calorímetro diferencial de barrido DSC Q-100 (TA Instruments; Estados Unidos).

2.3.4 Espectroscopía Infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) mide la absorbancia de la luz infrarroja de una muestra y genera un espectro basado en los grupos funcionales del material. Es un método empleado para determinar las estructuras específicas de moléculas. Esta técnica ha sido empleada en el análisis de la estructura y grupos funcionales presentes en la queratina y productos a base de esta proteína. Los enlaces moleculares que poseen momento dipolar que puede cambiar por desplazamiento atómico debido a vibraciones naturales presentan absorción de la radiación IR; estas vibraciones pueden ser medidas por espectroscopía infrarroja (Baker y col., 2014).

La técnica se basa en la absorción de la radiación IR por las moléculas en vibración; un rayo de luz infrarroja atraviesa la muestra, y se registra la cantidad de energía absorbida en cada número de onda y que corresponde a la inversa de la longitud de onda expresada en cm^{-1} . El espectro infrarrojo obtenido es consecuencia de la absorción de la radiación electromagnética a diferentes frecuencias que se correlaciona con la vibración de conjuntos específicos de enlaces químicos dentro de una molécula.

Es una propiedad física única de una molécula, siendo considerado como una “huella dactilar” para la identificación del espectro de un compuesto desconocido por comparación con un espectro de referencia (Coates, 2006).

En la zona del espectro correspondiente al infrarrojo medio (4000 a 1300 cm^{-1}) se suelen observar una serie de bandas de absorción provocadas por las vibraciones entre 2 átomos de la molécula únicamente. Estas vibraciones derivan de grupos que contienen hidrógeno o de grupos con dobles o triples enlaces aislados (Figura 2.11).

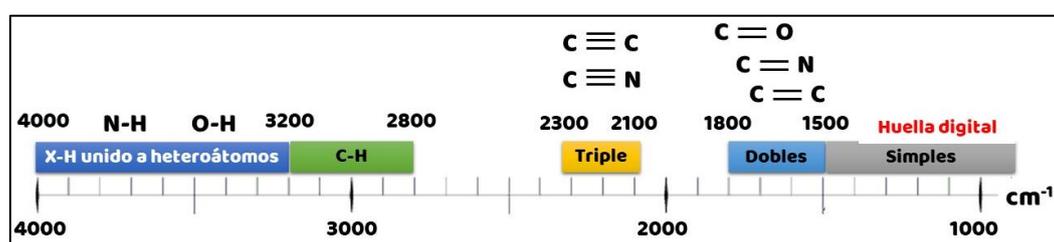


Figura 2.10. Escala de longitudes de onda del espectro infrarrojo e infrarrojo lejano y vibraciones asociadas.

La zona del infrarrojo lejano de 1450 a 600 cm^{-1} es la conocida como huella dactilar (Baker y col., 2014) y está asociada a la flexión de enlaces CH, CO, CN, CC, etc.; en esta región espectral, pequeñas diferencias en la estructura y constitución de las moléculas dan lugar a variaciones importantes en los máximos de absorción.

Otras regiones de interés para el análisis de queratina son la *Amida I* (1690-1600 cm^{-1}); *Amida II* (1575-1480 cm^{-1}) y la *Amida III* (1320 – 1210 cm^{-1}) (Barton, 2011); en la figura 2.11 se muestran los modos de vibración para la *Amida I*, *Amida II* y la *Amida III* para la α -queratina.

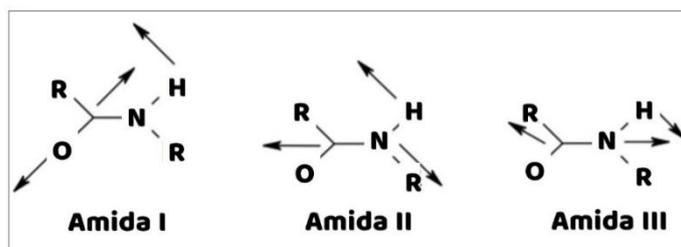


Figura 2.11. Modos de vibración para la Amida I, Amida II y la Amida III para la α -queratina (Adaptado de Barton, 2011).

Otros modos de vibración que están presentes incluyen los aminoácidos de cadena lateral que tienen deformación de C-H ($1471\text{-}1460\text{ cm}^{-1}$), deformaciones CH_2 y CH_3 ($1453\text{-}1443\text{ cm}^{-1}$ y $1411\text{-}1399\text{ cm}^{-1}$), y estiramientos de óxido de cistina que consisten en los estiramientos asimétricos y simétricos de ácido cisteico (1171 y 1040 cm^{-1}), el dióxido de cistina simétrico (1121 cm^{-1}) y el estiramiento monóxido de cistina (1071 cm^{-1}) ((Barton, 2011).

Los espectros infrarrojos con transformada de Fourier (FTIR) de los derivados de queratina en el presente trabajo de tesis fueron obtenidos con un espectrofotómetro IR (Vertex 70, Bruker, Alemania) perteneciente al Centro de Investigación y Desarrollo de Ciencias Aplicadas (CINDECA).

Se trabajó en un rango de números de onda desde 4000 a 400 cm^{-1} . Para cada muestra se colectaron 60 barridos con una resolución de 4 cm^{-1} que fueron acumulados. Para generar el promedio correspondiente a cada muestra los datos obtenidos se procesaron utilizando el software OPUS (OPUS, Bruker Optics, USA). Los polvos de los derivados de queratina se trituraron con bromuro de potasio purificado y se comprimió hasta formar una pastilla por la cual se hizo incidir la radiación IR.

2.3.5 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) con Reflectancia total atenuada (ATR)

La espectroscopía FTIR – Reflectancia total atenuada (ATR), conocida también como Espectroscopía de reflexión interna (IRS), es un método de medida del espectro IR. En esta técnica, la radiación infrarroja se dirige a un elemento de reflexión interna (IRE), el cual es un medio fabricado de un material cristalino con alto índice de refracción como el diamante y transmite la radiación en la región espectral de interés (Figura 2.12).

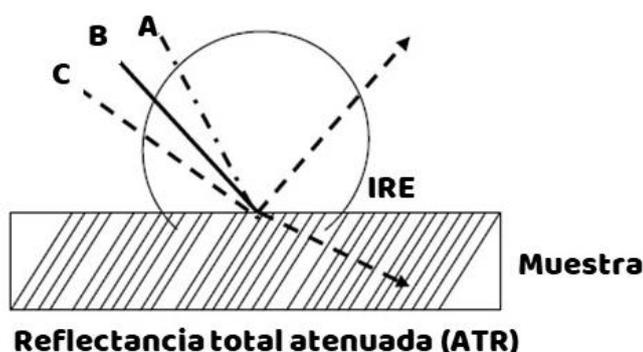


Figura 2.12 Reflexión interna total en espectroscopia ATR
(Adaptado, Barton, 2011)

El ángulo de incidencia de radiación IR θ_i sobrepasa el ángulo crítico θ_c . Cuando la radiación incide en la interface entre el IRE y la muestra con un índice de refracción menor, se alcanza la reflexión total interna (Barton, 2011). La reflectancia interna crea una onda evanescente que se extiende más allá de la superficie del cristal y penetra sólo una pequeña distancia dentro de la muestra. Como las muestras absorben la radiación IR a ciertas frecuencias, los resultados de ATR estar atenuados en regiones del espectro donde la muestra absorbe energía (Barton, 2011). El espectro obtenido no será idéntico al obtenido por transmisión, se introducen pequeños cambios en la intensidad de las bandas y

una variación en la frecuencia. El cambio en la intensidad relativa es conocido y fácilmente corregido con OMNIC software.

La ventaja de la espectroscopía ATR es que es una técnica no destructiva y muy sensible, se puede utilizar para medir las propiedades de capas de material muy delgadas o muestras quebradizas, permitiendo el análisis de superficie para materiales frágiles y con alta absorción, como las fibras de α -queratina (Barton, 2011).

Los espectros infrarrojos de transformada de Fourier (FTIR) de los derivados queratina en el presente trabajo de Tesis se obtuvieron con un espectrómetro, equipo Nicolet IS10 (Thermo- Scientific) (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA) con accesorio de ATR (diamante). Se trabajó en un rango de números de onda desde 4000 a 400 cm^{-1} . Para cada muestra se colectaron 60 barridos con una resolución de 4 cm^{-1} que fueron acumulados. Los datos obtenidos se procesaron utilizando el software OMNIC TM de Thermo ScientificTM.

2.3.6 Determinación de la microestructura mediante microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica de barrido (SEM: Scanning electron microscopy) permite estudiar las características microestructurales de la superficie de diferentes materiales. Su alta resolución (de 20 a 50 Å) y gran profundidad de foco (aproximadamente entre 100 y 1000 veces mayor que la de un microscopio óptico a la misma magnificación) brinda imágenes con apariencia tridimensional.

Las micrografías SEM de los materiales diseñados en el presente trabajo de Tesis se obtuvieron con un microscopio FEI, modelo Quanta 200, Holanda (Figura 2.13) en condiciones de alto vacío.

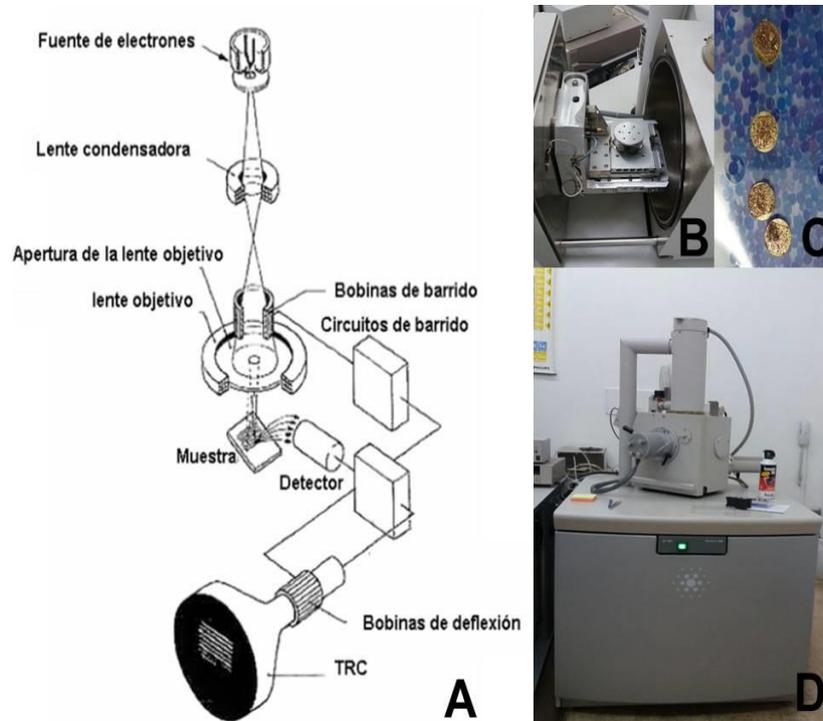


Figura 2.13. A. Diagrama esquemático de un microscopio electrónico de barrido (Kang y col., 2013). B. Cámara porta-muestras C. Muestras recubiertas con oro. D. microscopio electrónico de barrido FEI, modelo Quanta 200 (LIMF, UNLP).

2.3.7 Análisis textural

El análisis textural desempeña un papel fundamental en la comprensión de la estructura, la composición y las propiedades mecánicas que influyen en el comportamiento de un biomaterial. Entre los métodos empleados para evaluar estas características se encuentra el análisis de perfil de textura (TPA, por sus siglas en inglés, Texture Profile Analysis), esta técnica mide la fuerza y la deformación de un material cuando se somete a una carga, permite obtener información cuantitativa sobre varios parámetros que definen la textura del

material como la dureza, la elasticidad y la cohesividad, fundamentales para el diseño y la optimización de productos (Figura 2.14).



Figura 2.14. Texturómetro Brookfield PRO CT con una sonda TA4/1000.
Ensayo de TPA para esponjas de queratina.

Entre los parámetros de interés se presentan:

- La dureza es una medida de la resistencia de un material a la deformación plástica o a la penetración. En el contexto de esponjas, la dureza puede reflejar la rigidez de la estructura de la esponja y su capacidad para soportar cargas externas. Se puede definir matemáticamente como el valor de la carga máxima (N) en el ciclo de compresión.
- La elasticidad (adimensional) es una medida de la capacidad de un material para volver a su forma original después de ser deformado. En esponjas, la elasticidad puede indicar la flexibilidad de la matriz polimérica. Se determina como el cociente entre L_2/L_1 (Figura 2.15).
- La cohesividad (adimensional) se refiere a la capacidad del material para mantener su integridad interna durante la deformación. Es una medida referente de la fuerza de las interacciones entre las moléculas de un

material. En el caso de esponjas, esto podría relacionarse con la resistencia de la estructura a separarse en diferentes partes. Se define matemáticamente como el cociente entre los valores de dureza del ciclo 2 y la dureza del ciclo 1 (Figura 2.15): D_{C2}/D_{C1}

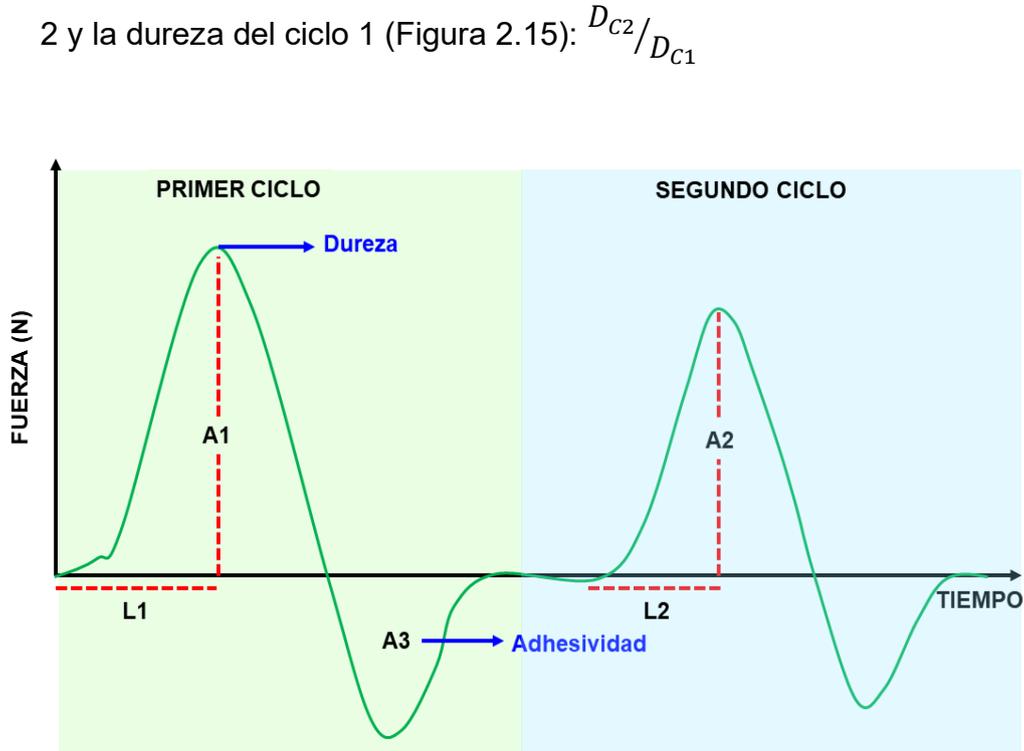


Figura 2.15. Diagrama de un perfil mecánico textural típico del análisis de perfil de textura (TPA).

METODOLOGÍAS DE SOLUBILIZACIÓN DE PLUMAS DE POLLO PARA LA OBTENCIÓN DE QUERATINA

CAPITULO III



3.1 Introducción

La queratina presente en las plumas de pollo es altamente insoluble en solventes polares, debido en gran parte al alto contenido de los grupos Cistina, los cuales mantienen las cadenas polipeptídicas en una estructura tridimensional (Gupta y col., 2012), dificultando la utilización de la proteína en diferentes procesos. Para lograr la solubilización es necesario la modificación de la estructura rompiendo las uniones intramoleculares como los puentes disulfuro y enlaces de menor energía como los puentes de hidrógeno y las fuerzas de Van der Waals, sin afectar los enlaces peptídicos. La reducción de los puentes disulfuro puede hacerse de diversas formas, dependiendo del agente reductor empleado.

Existen diversos métodos de obtención y extracción de las queratinas a partir de las diferentes biomasas (Figura 3.1). La extracción implica al menos la escisión de los enlaces disulfuro (S-S), rompiendo las microfibrillas para proporcionar las moléculas de queratina separadas (Schrooyen y col., 2007).

3.1.1 Métodos químicos de reducción de queratina

La queratina es una estructura estable debido al gran número de enlaces disulfuro (-S-S-) en la cadena polipeptídica (Shavadi y col, 2017). El uso de agentes químicos que contienen tioles (agentes reductores) disminuyen dicha estabilidad mediante el rompimiento de los enlaces disulfuro, los puentes de hidrógeno y los puentes salinos (Gupta y col., 2012), generando una clase de proteínas conocidas como **Querateinas** (Vineis y col., 2019).

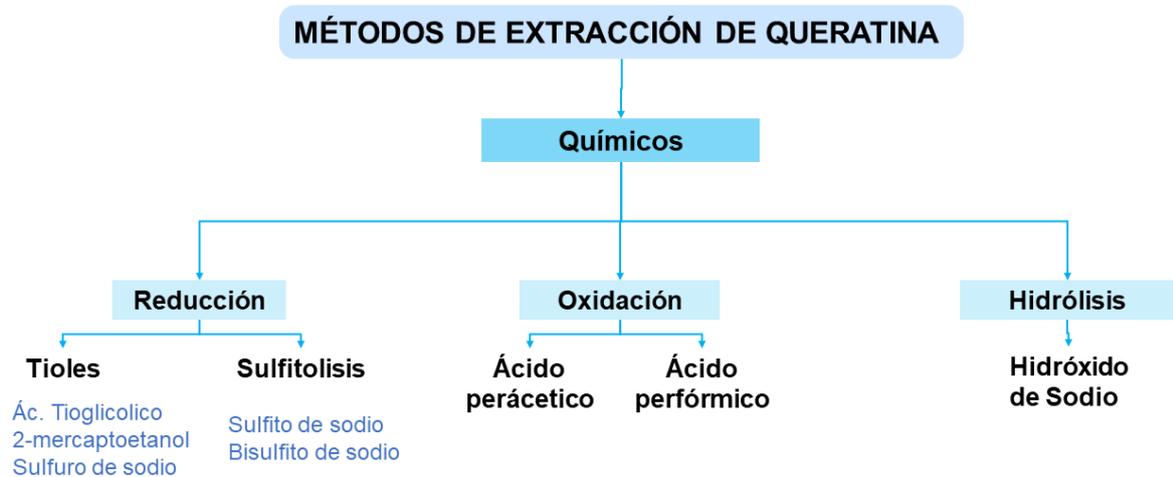
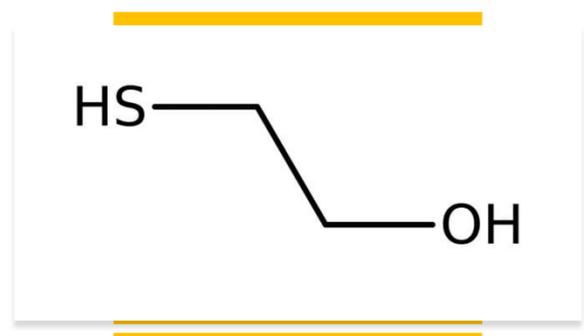


Figura 3.1 Clasificación de varios métodos de extracción química de queratina a partir de biomásas con alto contenido de materiales queratinosos, como la lana, plumas y cuernos (Adaptado de Shavadi y col, 2017).

3.1.1.1 Tioles

Varios tipos de agentes reductores han sido empleados en presencia de agentes desnaturalizantes y para un amplio rango de pH. Los tioles más comúnmente usados son el ácido tioglicólico, el 2-mercaptoetanol (2-MEC) y el ditioneitol (DTT).

El 2-mercaptoetanol ($\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$, 2-Hidroxi-1-etanol) es uno de los agentes reductores con mejores rendimientos de extracción de queratina, al ser un tior que provee su grupo funcional (-SH) para la escisión de los enlaces disulfuro sin dañar la cadena principal de la proteína de queratina (Zhou y col., 2014).



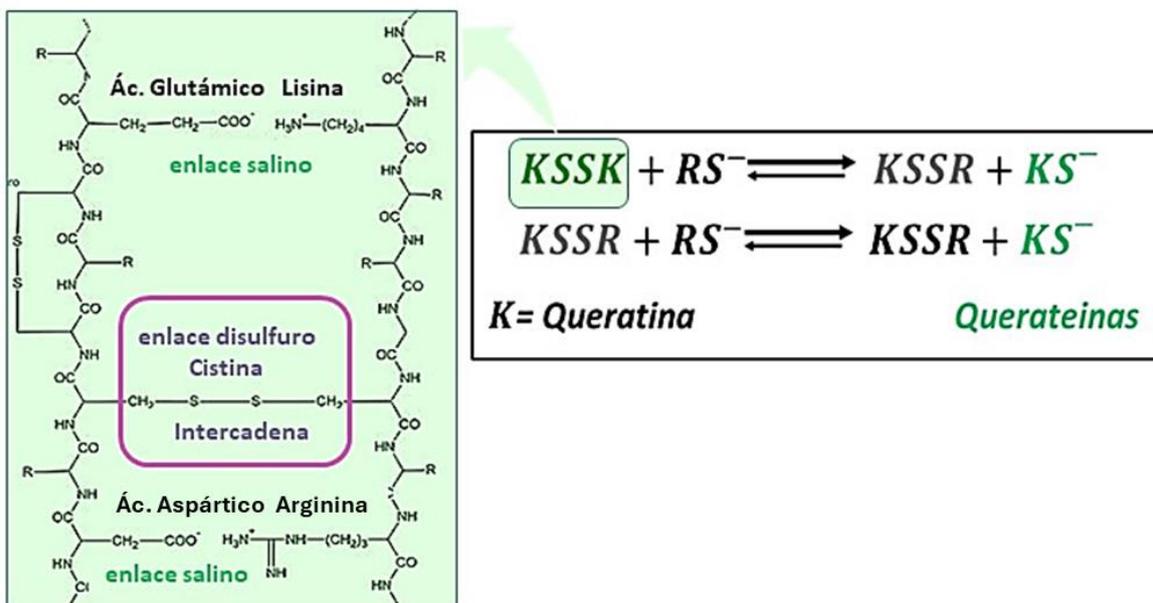
Fórmula del 2-mercaptoetanol

Sin embargo, el uso de mercaptoetanol se restringió a lo largo del tiempo debido a su alta toxicidad que causa irritación en las vías nasales y el tracto respiratorio al ser

**Capítulo III. Metodologías de solubilización de plumas de pollo
para la obtención de queratina**

inhalado, vómitos y dolor de estómago al ser ingerido, y absorción potencialmente fatal al entrar en contacto con la piel (Sinkiewicz y col., 2017). Por otra parte, su costo es elevado y dependiendo la disposición de los productos obtenidos, no termina siendo rentable (Sharma y col., 2018; Shavadi y col., 2015).

El mecanismo de reacción de extracción de queratina por reducción empleando tioles, consiste en dos reacciones reversibles de desplazamiento nucleofílico (Reacción 3.1). Bajo condiciones básicas, el anión tiol se forma y reduce los enlaces disulfuro de la cisteína favoreciendo una doble sustitución nucleofílica y solubilizando los compuestos de queratina (Collie y col., 2014; Vineis y col., 2019). Los grupos tioles del material queratinoso reducido se oxidan fácilmente en presencia del aire para formar grupos disulfuro, es por esta razón que los tioles son usualmente bloqueados por una alquilación inmediata tras el proceso de reducción (Vineis y col., 2019).



Reacción 3.1. Reducción de los enlaces disulfuro de la cistina mediante un tiol como agente reductor. (Adaptado de Collie y col., 2014)

**Capítulo III. Metodologías de solubilización de plumas de pollo
para la obtención de queratina**

Otros agentes reductores han sido empleados para la solubilización en medio alcalino como los sulfuros, anhídrido bórico, fosfinas o combinaciones entre ellos. Se ha utilizado en menor medida sulfuro de amonio debido a su toxicidad y a la formación de residuos de sal en el producto final (Schrooyen y col., 2007). El método de reducción con tioles ha sido utilizado ampliamente para extraer la queratina a partir de plumas de pollo con muy buenos rendimientos. Yamamuchi y col. (1996) reportaron la solubilización de plumas mediante un método que incluía 2-mercaptoetanol (2-MEC), Urea [7M] y SDS a pH neutro y durante 12 h; Schrooyen y col., (2000) optimizaron el proceso de reducción con 2-mercaptoetanol al aumentar el pH con urea; utilizaron en la etapa de solubilización concentraciones de 0,125 M de 2-MEC, 8 M de Urea y 0,25 M de Tris-HCl a pH 7-9 y 60 °C, obteniendo rendimientos superiores al 75 %. En un estudio más reciente Sinkiewicz y col., (2016) reportaron una etapa de solubilización que incluía el uso de 2-mercaptoetanol y DTT a 50 °C por 2 h.

3.1.1.2 Reducción empleando Sulfuro de sodio

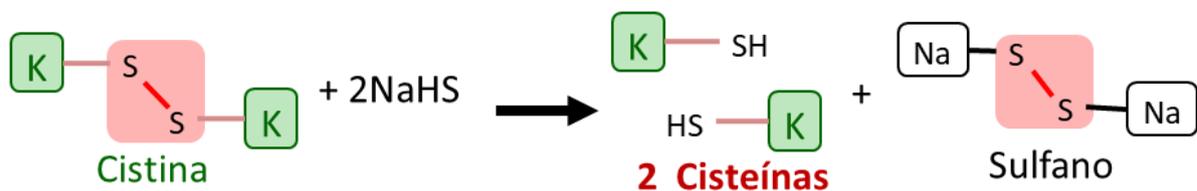
El sulfuro de sodio (Na_2S) puede ser tan efectivo como el 2-mercaptoetanol, además de ser menos peligrosa su manipulación en relación a su toxicidad (Schrooyen y col., 2007). Este reactivo es una sal incolora que cuando se disuelve en agua, reacciona para formar hidrógeno sulfuro de sodio (NaHS) e iones de hidroxilo (Reacción 3.2), incrementando el pH de la solución (medio alcalino) (Poole y Lyons, 2011).



Reacción 3.2. Formación de Hidrógeno sulfuro de Sodio en medio alcalino a partir de la disolución de Sulfuro de sodio.

**Capítulo III. Metodologías de solubilización de plumas de pollo
para la obtención de queratina**

Favorece la degradación de la queratina a través de una hidrólisis alcalina actuando como agente reductor al romper los enlaces disulfuro intra e intermoleculares de la proteína (Reacción 3.3). De esta manera quedan mayoritariamente grupos –SH libres de residuos de cisteína (Schrooyen y col., 2007).

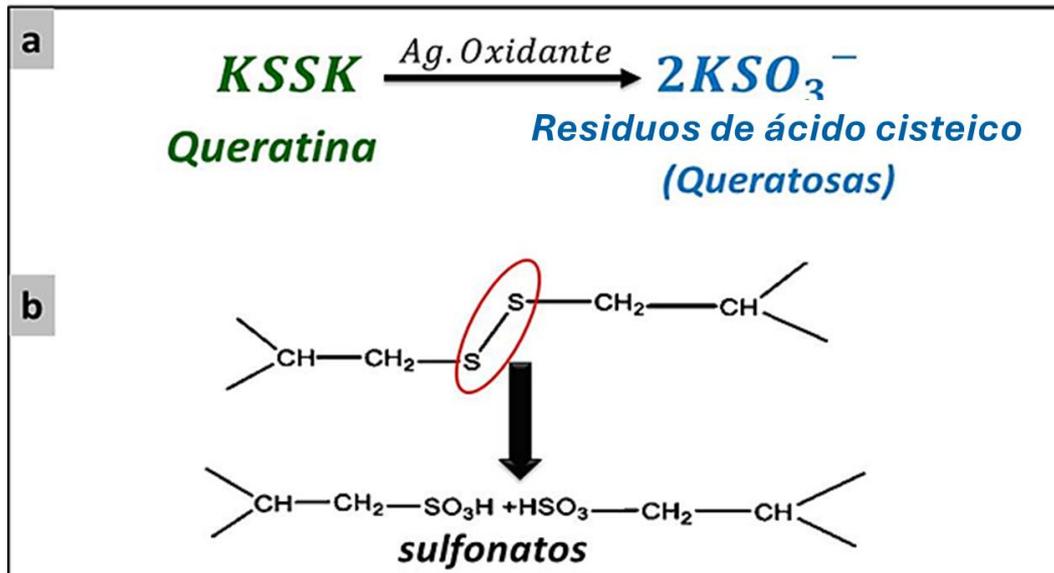


Reacción 3.3. Reducción de los enlaces disulfuro de la cistina mediante un NaHS como agente reductor. (Adaptado de Salazar Cedillo, 2013).

Varios autores han reportado el eficiente uso del método de reducción empleando como agente reductor al Sulfuro de sodio (Na_2S) en condiciones alcalinas. Wrześniewska-Tosik y Adamiec, (2008) solubilizaron las plumas de pollo y extrajeron queratina aplicando la reducción con Na_2S 0,1 M y variando la temperatura entre 40 y 60 °C con un tiempo de reacción de 1 h. Poole y col., (2011) aplicaron una etapa de solubilización con una solución de Na_2S [128 mM] a 30°C por 1 h; Gupta y col., (2012) reportaron el uso de Na_2S [128 mM] a 30°C por 6 h y más adelante en Sharma y col., (2018) usaron Na_2S [500 mM] a 50 °C y durante 6 h, reportando rendimientos de extracción superiores al 80 %.

3.1.2 Métodos químicos de oxidación de queratina

Los métodos de oxidación se realizan generalmente con agentes oxidantes fuertes como el ácido perfórmico, peracético, permanganatos, peróxidos, entre otros, provocando el rompimiento de los enlaces disulfuro para generar residuos de ácido cisteico ($-\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$) (Reacción 3.4).

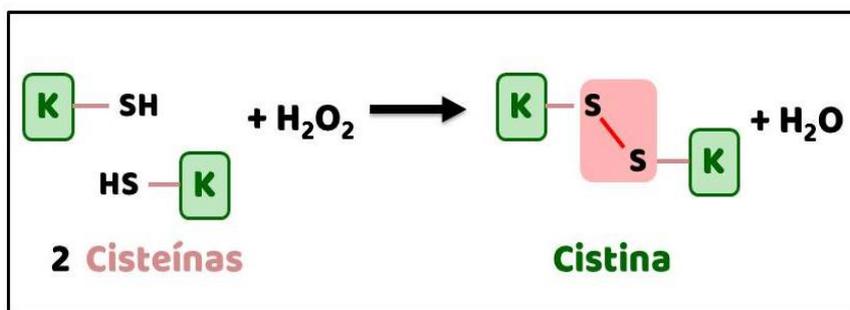


Reacción 3.4. a) Reacción de oxidación de queratina con ácidos peracéticos/perfórmico (Adaptado de Collie y col., 2014), b) Esquema del rompimiento de enlaces disulfuro y formación de los residuos de ácido cístico (grupos sulfonatos; HSO_3) (Adaptado de Shavadi y col., 2017).

Las queratinas oxidadas se conocen como *queratosas* caracterizadas por tener una estructura con enlaces no covalentes (Collie y col., 2014, Vineis y col., 2019). Estas reacciones son muy lentas en comparación con el uso de agentes reductores (Gupta y col., 2012). Las queratinas extraídas por oxidación con ácido perfórmico o peracético pueden ser separadas en tres fracciones α -queratosas, β -queratosas y γ -queratosas, según su solubilidad a diferentes valores de pH, en las barbas de plumas se ha reportado una relación de dichas fracciones de 31/18/35 % respectivamente (Earland y Knight, 1956).

3.1.2.1 Oxidación con Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

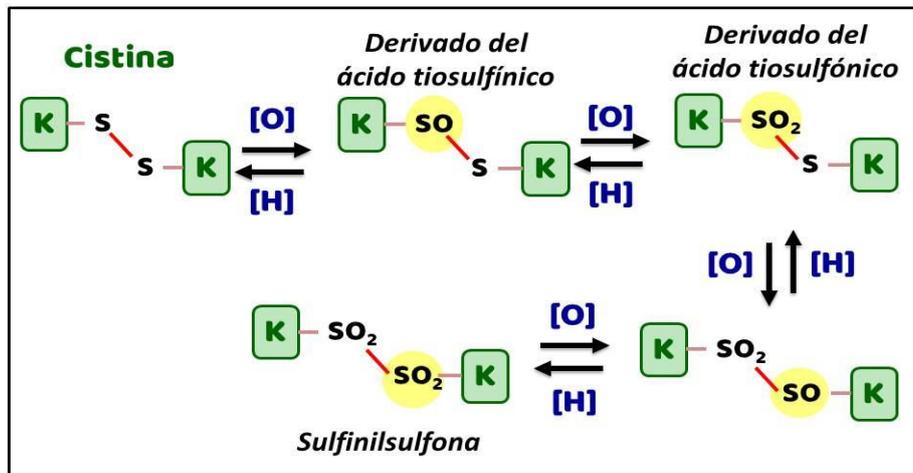
El peróxido de hidrógeno es un compuesto altamente polar que se descompone fácilmente en oxígeno y agua con liberación de calor; ha sido empleado como agente oxidante en el blanqueamiento de lana de oveja; en este proceso Gacén-Guillen (1969) reportó la presencia de fibras solubles de queratina en medio alcalino. La reacción más común que se puede dar en un tratamiento con H₂O₂, es una oxidación reversible de 2 moléculas de cisteína para formar una molécula de cistina mediante un puente y agua (Reacción 3.5)



Reacción 3.5: Paso 1 de la reacción de oxidación con peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Oxidación de dos moléculas de cisteína para formar una molécula de cistina mediante un enlace disulfuro.

Esto se produce debido a que el grupo sulfhídrico de la cisteína es muy reactivo. Una vez formados los enlaces disulfuro de la queratina, estos pueden ser oxidados de diferentes maneras a un derivado del ácido tiosulfínico, o un derivado del ácido tiosulfónico o seguir el proceso de oxidación hasta formar sulfinilsulfona (Reacción 3.6). Si la queratina que se desea obtener es para uso cosmético, la oxidación debe producirse solamente hasta el grupo sulfóxido. Borja Fernández-d'Arlas (2018) reportó en su trabajo la oxidación de queratina de pluma de pollo y de lana aplicando un tratamiento con H₂O₂, obteniendo proteínas con alta solubilidad en agua, bajo punto isoeléctrico, baja fracción de estructuras α -hélice y menor capacidad de reformación

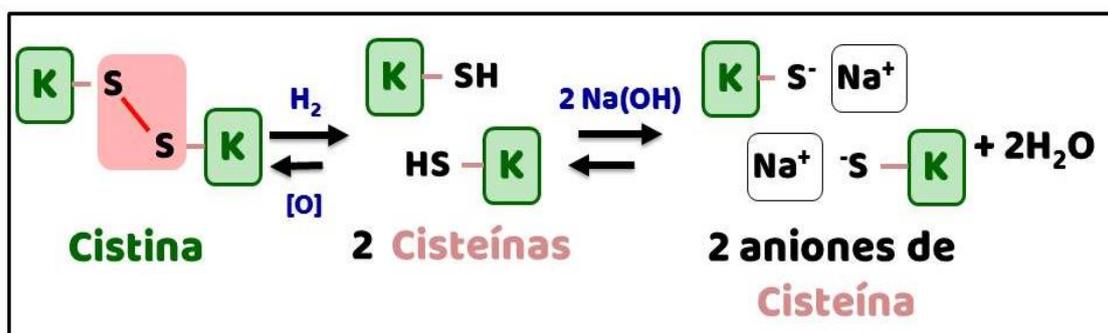
de los enlaces disulfuro debido a la posible presencia de otras especies más estables como grupos sulfénico (K-SOH), sulfínico (K-SO₂H) o ácido sulfónico (K-SO₃H).



Reacción 3.6: Paso 2: Etapas de la oxidación de la cistina por peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

3.1.3 Método químico de hidrólisis con hidróxido de sodio:

El empleo de hidróxido de sodio (NaOH) junto con moderadas a altas temperaturas, puede provocar la hidrólisis de las moléculas de cistina presentes en la queratina dando lugar a aminoácidos libres modificados y solubles en agua (Nagai y col., 1970), mediante el mecanismo de Swan (Reacción 3.7).



Reacción 3.7. Hidrólisis de la molécula de cistina en medio alcalino (Hidróxido de sodio). Rompimiento de los enlaces disulfuro para formar aniones de cisteína.

Cuando se trata biomasa con alto contenido de materiales queratinosos con una solución de hidróxido de sodio (medio alcalino), el núcleo de la molécula que contiene una alta concentración de azufre, comienza a separarse y se produce la degradación

**Capítulo III. Metodologías de solubilización de plumas de pollo
para la obtención de queratina**

de los residuos de cistina. Las moléculas de queratina pueden ser degradadas en condiciones alcalinas a $\text{pH} > 9$; altas concentraciones y elevadas temperaturas producen la hidrólisis irreversible de dichas moléculas (Shavandi y col., 2017). Además, el medio alcalino que proporciona el hidróxido de sodio promueve la remoción de los protones, y en consecuencia la ruptura de los enlaces iónicos. Por ello, el NaOH tiene un rol muy importante en la solubilización de las plumas de pollo (Gupta y col., 2012).

El hidróxido de sodio puede ser considerado como un reactivo menos tóxico y más económico que otros empleados en la extracción de queratinas a partir de plumas de pollo, sin embargo, los procesos suelen usar altas concentraciones y requieren una posterior etapa de neutralización.

3.1.4 Modificaciones químicas

Las modificaciones químicas de la queratina pueden hacer estable la estructura macromolecular de la proteína extraída o incrementar el número de entrecruzamientos covalentes inter e intramoleculares en la matriz polimérica de los productos finales. Las reacciones de reducción e hidrólisis para la extracción de queratina soluble son reversibles y pueden presentar la reformación de enlaces disulfuro (-S-S-) tanto a nivel inter como intramolecular, formando agregados de queratina insolubles. Uno de los propósitos de la modificación es excluir parcialmente los grupos sulfhidrilos libres (-SH, grupos tiol) para evitar la reformación de los enlaces disulfuro inter e intramoleculares y minimizando la formación de dichos agregados proteicos (Schrooyen y col., 2007, Shavadi y col., 2017). Las queratinas extraídas tienen grupos tioles libres que permanecen activos y los cuales son capaces de reformar los puentes disulfuro.

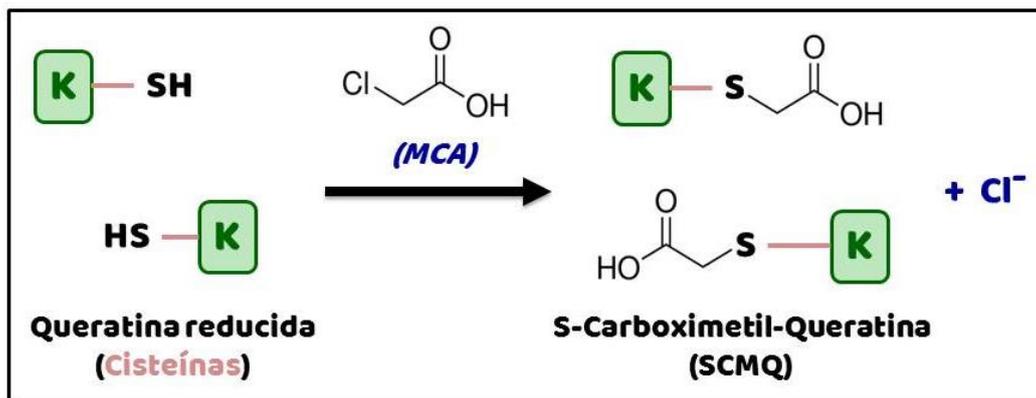
**Capítulo III. Metodologías de solubilización de plumas de pollo
para la obtención de queratina**

La oxidación de los grupos tioles se da sin ningún ordenamiento específico de las estructuras α - hélice y hoja- β *plegada*; la agregación entre las cadenas se produce durante la etapa de diálisis y el secado por liofilización de la queratina.

Entre los modificadores químicos más populares usados con el fin de evitar el reentrecruzamiento entre las cadenas aminoacídicas, se encuentran compuestos halogenados capaces de oxidar y captar el grupo tiol aún en condiciones ambientales (T= 20 °C). Algunos de estos modificadores ampliamente utilizados son: la *monoiodo acetamina* (Nakata y col., 2015; Tachibana y col., 2006; Schrooyen y col., 2000), el ácido monoiodoacético (Nakata y col., 2015; Schrooyen y col., 2000), ácido monobromosuccínico (Schrooyen y col., 2000), el ácido monocloroacético (Wrzesniewska-Tosik y Adamiec, 2007), entre otros. Estos compuestos pueden reaccionar selectivamente mediante una sustitución nucleofílica con los grupos tioles a valores de pH entre 7,5–8,5 (Sánchez Ramírez y col., 2019).

3.1.4.1 Carboximetilación de la queratina con ácido monocloroacético

El ácido monocloroacético (MCA; $Cl-CH_2COOH$) es un ácido acético halogenado, producto de sustitución de los ácidos monocarboxílicos alifáticos obtenido por cloración del ácido acético. La carboximetilación con ácido monocloroacético, en condiciones alcalinas fuertes, es uno de los métodos de modificación más convenientes para introducir grupos carboxílicos (-COOH) en la queratina reducida y minimizar la reformación de enlaces disulfuro (*reoxidación de cisteína a cistina*) (Reacción 3.8).



Reacción 3.8. Modificación de la queratina reducida por carboximetilación con ácido monocloroacético (MCA), formando S-Carboximetil-Queratina (SCMQ).

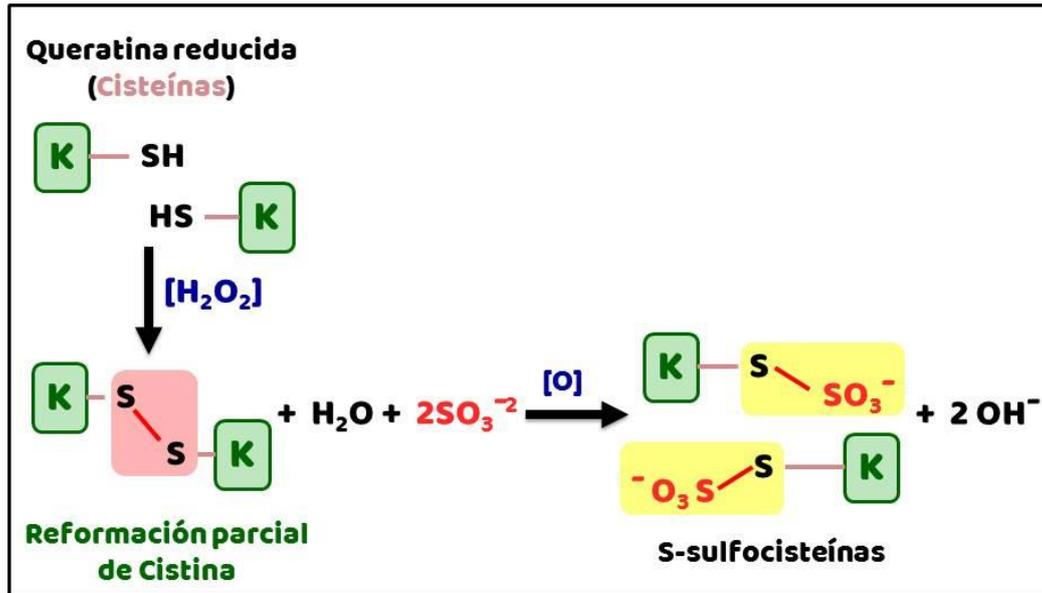
En esta reacción el grupo $-\text{COOH}$ del ácido monocloroacético (MCA) reacciona con los grupos $-\text{SH}$ libres de la queratina reducida, evitando que estos se vuelvan a formar y dando como producto *S-Carboximetil-queratina* (SCMQ) (Schrooyen y col., 2000). Wrzesniewska-Tosik y Adamiec (2007) reportaron la modificación de queratina reducida proveniente de plumas mediante carboximetilación con ácido monocloroacético. Por otro lado, Schrooyen y col., (2000) y Nakata y col., (2015); realizaron la modificación por carboximetilación empleando ácido monoiodoacético en queratinas reducidas con 2-mercaptoetanol.

3.1.4.2 Modificación por sulfitolisis oxidativa

Otro método de modificación empleado es el de sulfitolisis oxidativa, consiste en una primera etapa donde se utilizan peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que debido a sus propiedades oxidantes reacciona con los grupos $-\text{SH}$ libres de la queratina reducida, evitando la reformación total de los enlaces disulfuro (reoxidación parcial) e impartiendo propiedades características que variarán según el grado de modificación buscado (Schrooyen y col., 2007), seguido de una segunda etapa que consiste en un tratamiento con bisulfito de sodio como fuente de iones sulfito que reaccionan por

medio de un ataque nucleofílico con los enlaces disulfuro de la cistina reformada (Collie y col., 2014; Shavandi y col., 2017).

En la Reacción 3.9 se observa la reacción de sulfitolisis oxidativa donde el enlace disulfuro es convertido en dos aniones S-sulfonato en un proceso irreversible formando S-sulfocisteína (Collie y col., 2014).



Reacción 3.9. Modificación por sulfitolisis oxidativa de queratina reducida, formación de S-sulfocisteínas.

La oxidación de la cisteína a ácido cisteico usando ácido perfórmico o la conversión de cisteína a S-sulfocisteína por sulfitolisis han sido usadas para obtener productos solubles (Schrooyen y col., 2007).

3.1.4.3 Modificación con SDS (dodecil sulfato sódico)

El dodecilsulfato sódico o lauril sulfato sódico, (SDS; $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$) es un compuesto tensioactivo aniónico, esta característica se la otorga su cadena alifática de 12 átomos de carbono unida a un grupo sulfato. Este reactivo se ha adicionado para evitar la agregación de las cadenas polipéptidicas en la etapa de diálisis en el proceso de

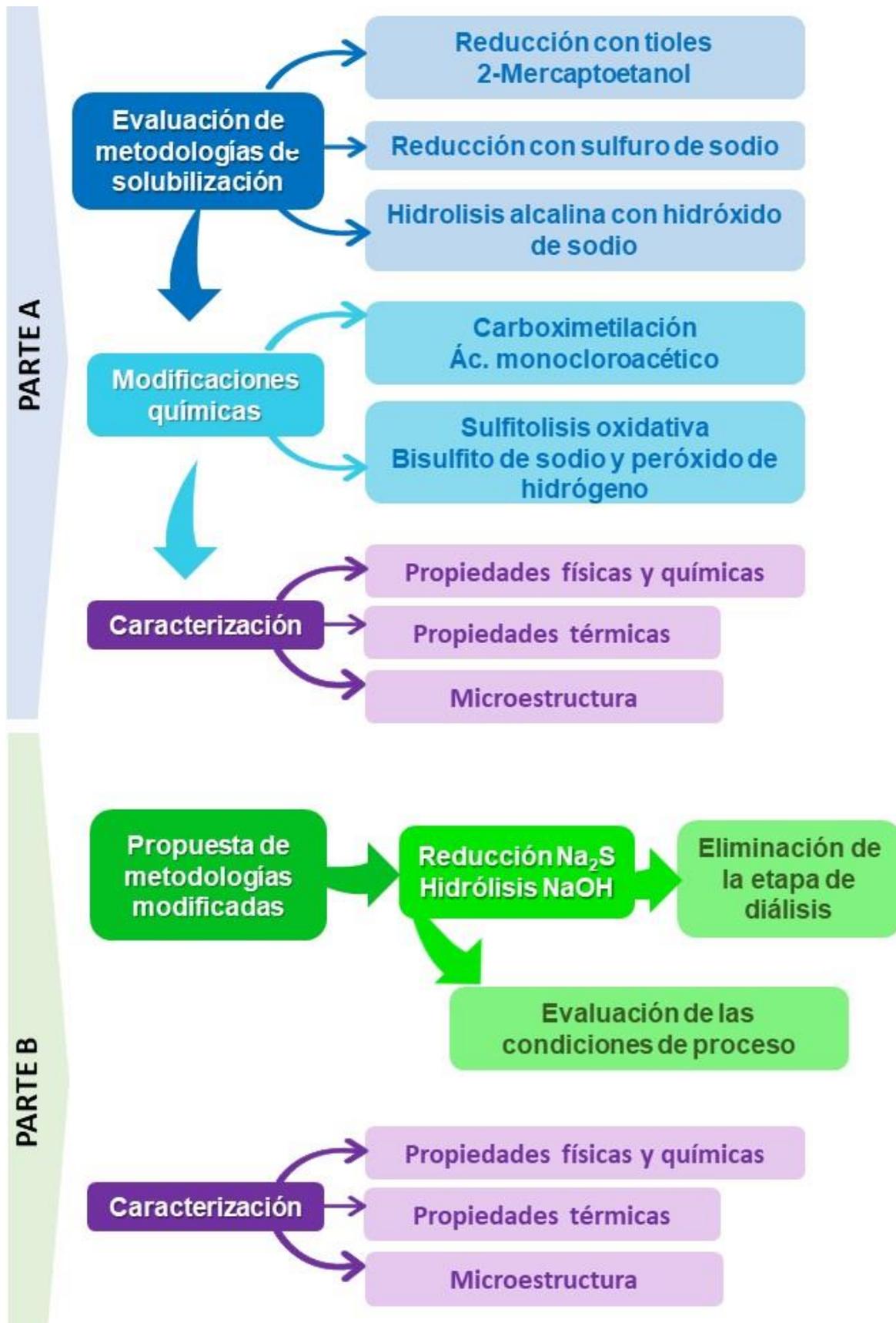
**Capítulo III. Metodologías de solubilización de plumas de pollo
para la obtención de queratina**

obtención de queratina mediante reducción con 2-mercaptoetanol (2-MEC) (Schrooyen y col., 2001).

Por otro lado, Zhou y col., (2014) han reportado métodos de extracción por sulfitólisis alternativos al uso de tioles de mayor toxicidad y costo como el 2-mercaptoetanol, donde el SDS ha sido empleado en conjunto con bisulfito de sodio (agente reductor por su capacidad de escindir los enlaces disulfuro (Vines y col., 2019)) y urea ((CO(NH₂)₂), agente desnaturizante que pertenece a la familia de las amidas alifáticas). Yamauchi y col., (1996) reportaron que el uso de SDS en la extracción de queratina a partir de lana previene la agregación de las cadenas polipeptídicas de la proteína debido a la reducción en la concentración de los agentes reductores y desnaturizantes durante la etapa de diálisis. Schrooyen y col (2001) probaron que el agregado de SDS durante la etapa de extracción de queratina a partir de plumas de pollo, no tuvo un efecto significativo en el aumento del rendimiento; sin embargo, demostraron que el agregado de SDS antes de la etapa de diálisis proporcionó estabilidad formando un complejo SDS-queratina, debido a que previene la agregación y la reformación de enlaces disulfuros intramoleculares por la re-oxidación de la cisteína a cistina. Cuando el SDS se emplea en altas concentraciones favorecen las interacciones intramoleculares de los puentes disulfuro, mientras que las bajas concentraciones favorecen las interacciones intermoleculares de puente disulfuro (Schrooyen y col., 2011).

En el presente capítulo se abordarán diferentes metodologías aplicadas en la obtención de queratina a partir de biomásas como las plumas de pollo y la caracterización de los derivados proteicos obtenidos. Se abordaron metodologías modificadas buscando procesos más simples, económicos y ambientalmente sustentables, que se indican en el siguiente esquema.

Esquema del capítulo III:



3.2 Objetivos específicos del Capítulo 3

- I. Aplicar y comparar diferentes técnicas de solubilización de plumas utilizando reactivos menos contaminantes y tóxicos y más amigables con el manipulador. Se aplicarán entre otros agentes reductores en medio alcalino y agentes oxidantes en medio ligeramente ácido para la obtención de derivados solubles de queratina.
- II. Estudiar el efecto de las condiciones del proceso de extracción (Temperatura, tiempo, concentración de los agentes reductores/oxidantes, entre otros), ajustando los valores óptimos de cada variable para incrementar los rendimientos del proceso.
- III. Modificar químicamente los productos derivados solubles de queratina con el fin de impartir propiedades funcionales específicas.
- IV. Caracterizar los derivados solubles proteicos obtenidos mediante métodos de reducción e hidrólisis, con o sin modificación química incluida.
- V. Obtener queratina hidrolizada en polvo con alta estabilidad, mediante secado por liofilización y caracterizar los productos obtenidos mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) y espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).
- VI. Evaluar procesos alternativos de obtención eliminando la etapa de diálisis, que permitan escalar a nivel industrial.

3.3 Metodologías de solubilización de plumas de pollo

Para la extracción de las queratinas insolubles a partir de la biomasa de plumas de pollo es necesario aplicar metodologías de solubilización seguras, efectivas y económicas; dichas metodologías de solubilización implican la escisión de los enlaces disulfuro (S-S), rompiendo las microfibrillas para lograr la separación de las moléculas de queratina (Schrooyen y col., 2007). Para lograr la solubilización de las plumas de pollo y la obtención de queratina soluble, en el presente trabajo de Tesis se aplicaron las siguientes metodologías de solubilización:

- a) Reducción de los enlaces disulfuro con tioles, empleando 2- mercaptoetanol como agente reductor; éste será el método de referencia.
- b) Reducción de los enlaces disulfuro con sulfuros de metales alcalinos, empleando como agente reductor el sulfuro de Sodio (Na_2S).
- c) Hidrólisis de las plumas de pollo en medio alcalino, empleando soluciones de hidróxido de sodio.

3.3.1 Método convencional de solubilización por reducción con tioles (agente reductor 2-mercaptoetanol)

Para la solubilización de las plumas de pollo se siguió el método convencional propuesto por Schrooyen y col., (2007) en la patente N. US 7.169.896 B2.

Se disolvieron 40 g de plumas previamente adecuadas, molidas y secas en 1 L de una solución que contenía: 125 mM de 2-Mercaptoetanol, 8 M de urea, 3 mM de EDTA en un buffer Tris 0,2 M a pH 9,0. La solubilización se llevó a cabo a 60 °C con agitación constante por 1 h controlando el pH a un valor de 9.

**Capítulo III. Metodologías de solubilización de plumas de pollo
para la obtención de queratina**

Posteriormente, se filtró con lienzo la dispersión de queratina obtenida con el fin de retirar los restos de las plumas que no se disolvieron. La solución de queratina se dializó usando una membrana de celulosa de 16 mm de diámetro y retención de peso molecular mayor o igual a 12 kDa (D9777, Sigma-Aldrich Co, St. Louis MO, USA), sumergida en agua destilada a temperatura ambiente por 48 h con varios cambios de agua, con el fin de retirar el exceso de reactivos remanentes.

3.3.2 Método de solubilización por reducción con sulfuro de sodio (Na₂S)

La solubilización de las plumas de pollo se realizó aplicando el sulfuro de sodio (Na₂S) como agente reductor en medio alcalino; esta solubilización se produce rompiendo los enlaces disulfuro de la queratina presente en la biomasa para formar un grupo tiol y queratina reducida. Se siguió el método propuesto por Schroyeen y col., (2007) con modificaciones.

Se disolvieron 40 g de plumas previamente acondicionadas en 1 L de solución sulfuro de sodio (Na₂S) 0,1 M en medio alcalino (pH= 9); se evaluaron dos condiciones de proceso:

- a) Reducción 1 (Red 1): solubilización durante 1 h a 60 °C con agitación constante.
- b) Reducción 2 (Red 2): solubilización durante 2 h a 40 °C con agitación constante.

La dispersión resultante se filtró con lienzo retirando el material no disuelto y se procedió a dializar la solución de queratina con una membrana de celulosa de 16 mm de diámetro con retención de peso molecular mayor o igual a 12 kDa (D9777, Sigma-Aldrich Co, St. Louis MO, USA), sumergiéndolas en agua destilada a temperatura ambiente por 48 h con varios cambios de agua.

3.3.3 Método de solubilización por hidrólisis con Hidróxido de sodio (NaOH)

La solubilización de plumas de pollo mediante la hidrólisis alcalina con hidróxido de sodio se realizó según el protocolo propuesto por Wrzesniwska-Tosik y col. (2007) con modificaciones.

Se disolvieron 40 g de plumas de pollo previamente acondicionadas en 1 L de solución de NaOH a pH entre 11 y 12. Se evaluó la solubilización a partir de tres concentraciones de NaOH (3, 4 y 5 % m/v) y dos condiciones de proceso:

a) Hidrolisis 1 (H1): solubilización durante 1 h a 60 °C con agitación constante.

b) Hidrolisis 2 (H2): solubilización durante 2 h a 40 °C con agitación constante.

Las dispersiones obtenidas se filtraron con lienzo con el fin de retirar los residuos de pluma sin disolver. Finalmente se realizó la diálisis contra agua destilada para extraer los reactivos durante 48 h cambiando el agua cada 24 h, mediante una membrana de celulosa de 16 mm de diámetro con retención de peso molecular mayor o igual a 12 kDa (D9777, Sigma-Aldrich Co, St. Louis MO, USA).

3.3.4 Etapas de modificación

Las reacciones de solubilización por reducción e hidrólisis en medio alcalino son reversibles, es decir, tras la solubilización de la queratina de las plumas de pollo quedan residuos de cisteína libres dando paso a la reformación de los puentes disulfuro (-S-S-) a nivel inter e intramolecular formando agregados de proteína insolubles en presencia de oxígeno (Schroyeen y col., 2001). Estos re-entrecruzamientos pueden impartir propiedades no deseadas al producto final, tales como resistencia a posteriores modificaciones químicas y/o físicas (Schrooyen y col., 2007).

Capítulo III. Metodologías de solubilización de plumas de pollo para la obtención de queratina

La modificación parcial de los grupos –SH libres, generalmente involucra una conversión química de dichos grupos a otros. Uno de los propósitos de la modificación es excluir a los grupos –SH modificados de la reformación de los enlaces disulfuro inter e intramoleculares, minimizando la formación de agregados insolubles de queratina.

Se realizaron 2 tipos de modificaciones químicas con el fin de prevenir la reformación de los puentes disulfuros en las soluciones de queratina obtenidas por las tres metodologías. La primera consistió en una carboximetilación de la queratina con diferentes concentraciones de ácido monocloroacético y la segunda una sulfitólisis oxidativa con peróxido de hidrógeno y sulfito de sodio.

a) Modificación por carboximetilación de la queratina

La carboximetilación de los grupos sulfhídricos utilizando un compuesto órgano-halogenado es un método que ha sido ampliamente empleada debido a que mejora la solubilidad de la queratina en todo el rango de la escala de pH (Schrooyen y col., 2001).

La carboximetilación de la queratina se realizó con ácido monocloroacético (MCA; ClCH_2COOH). El grupo carboxilo de éste reacciona con los grupos –SH libres de la queratina reducida evitando que éstos se vuelvan a reformar y dando como producto *S-Carboximetil-queratina (SCMQ)*. Se evaluaron dos concentraciones: 1) MCA 0,2 % (m/v) y 2) MCA 0,5 % (m/v). Las soluciones se agitaron durante 1 hora a 25 °C.

b) Modificación por sulfitólisis oxidativa

La sulfitólisis oxidativa de la queratina obtenida a partir de plumas de pollo se realizó en dos etapas; primero la queratina solubilizada es oxidada con peróxido de hidrogeno

**Capítulo III. Metodologías de solubilización de plumas de pollo
para la obtención de queratina**

como agente oxidante, este proceso permite la oxidación de los residuos cistina/cisteína a ácido cisteíco (Schrooyen y col, 2007), evitando la reformación total de los enlaces disulfuro (reoxidación parcial) e impartiendo propiedades características que variarán según el grado de modificación buscado (Schrooyen y col., 2007). Esto va seguido de una segunda etapa que consiste en un tratamiento con bisulfito de sodio como fuente de iones sulfito que reaccionan por medio de un ataque nucleofílico al puente disulfuro de la cistina reformada (Shavandi y col., 2017). A las soluciones de queratina obtenidas con las diferentes metodologías, se les adicionó 2 mL de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por cada 100 mL de solución de queratina, se calentó a 37 °C durante 24 h con agitación constante. A continuación, se adicionó 2 g de sulfito de Sodio (Na_2SO_3) por cada 100 mL de solución, se ajustó el pH a 9 y se continuó con la agitación durante 1 h más.

3.3.5 Diálisis

Una vez terminada la etapa de modificación, las soluciones se dializaron contra agua destilada durante 72 h con cambios de agua cada 24 h, mediante una membrana de celulosa de 16 mm de diámetro con retención de peso molecular mayor o igual a 12 kDa (D9777, Sigma-Aldrich Co, St. Louis MO, USA).

En la figura 3.2 se presenta la nomenclatura correspondiente a las metodologías de solubilización de plumas de pollo y las etapas de modificación, que fueron usadas en este capítulo.

Capítulo III. Metodologías de solubilización de plumas de pollo
para la obtención de queratina

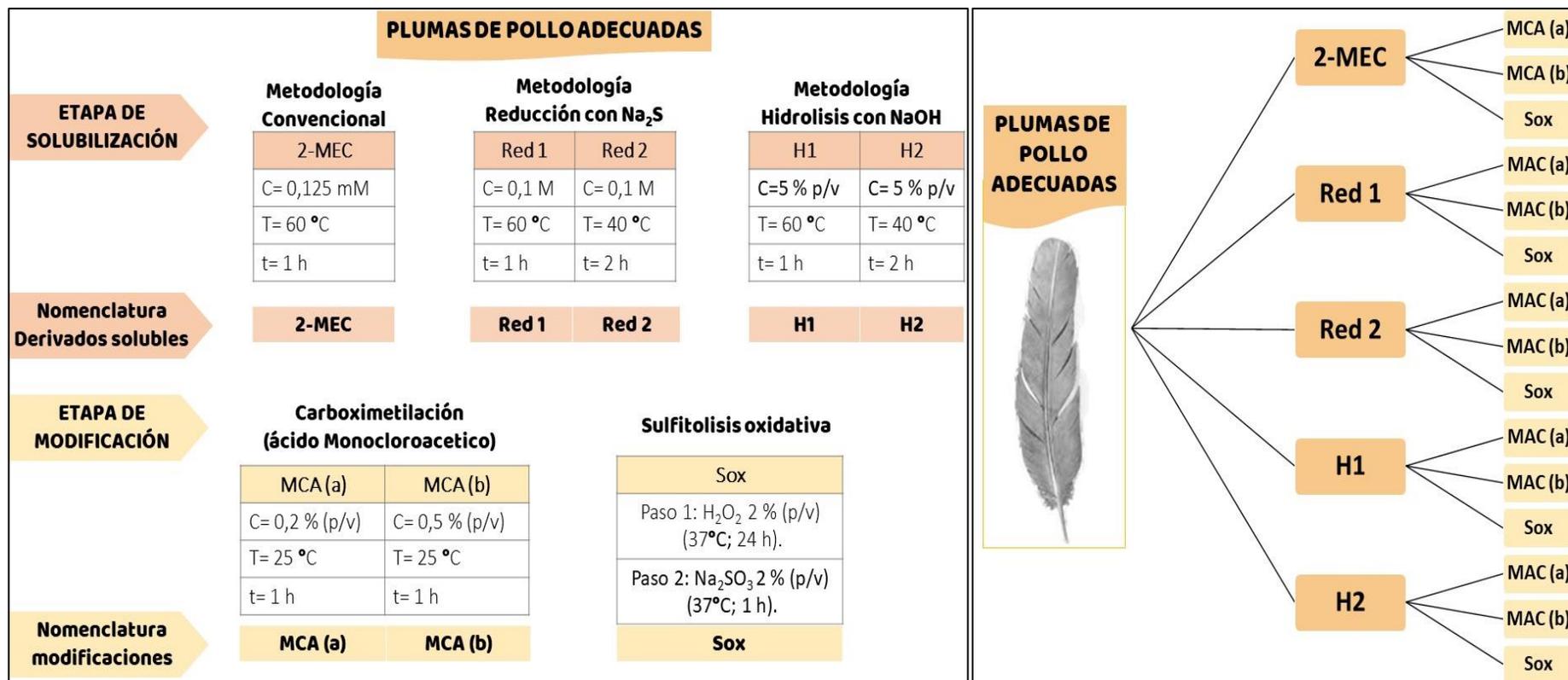


Figura 3.2. Esquema y nomenclatura de las metodologías de solubilización y etapas de modificación de las plumas de pollo.

3.3.6 Obtención de queratina en polvo

Las soluciones de queratina dializadas con y sin etapa de modificación incluida, se llevaron a pH 4,2 correspondiente al punto isoeléctrico de la proteína, usando ácido clorhídrico (HCl; 2M) con el fin de precipitarla (Schrooyen y col., 2007; Wrzesniewska-Tosik, 2007). Luego, se centrifugó por 15 minutos a 10 °C y 6500 rpm en una centrifuga SORVAL, se retiró el sobrenadante y los pellets obtenidos se lavaron con agua destilada y se almacenaron a una temperatura de – 40 °C por 2 días. Los pellets de queratina se liofilizaron por 48 h en un equipo HETO Modelo FD 4. Los productos derivados de queratina liofilizados se empacaron al vacío y almacenaron a 4 °C hasta su caracterización.

3.4 Caracterización de derivados solubles de queratina:

3.4.1 Rendimiento de extracción

Se determinó el rendimiento de solubilización de las plumas de pollo para las diferentes metodologías aplicadas. El porcentaje de pluma solubilizada (Sol_{pluma} , % p/p) se calculó a través de la Ecuación 3.1.

$$Sol_{pluma}(\%) = \left[\frac{(m_i - m_r)}{(m_i)} \right] * 100 \quad \text{Ec. 3.1}$$

donde m_i es la masa de plumas (secas) inicial, m_r es la masa de plumas sin disolver (secas).

3.4.2 Medición del pH

El pH de los derivados solubles de queratina se midió con un pHmetro Hach Sension+ pH3 Lab (Hach Company, Lovely, CO, USA) a 25 °C. Las mediciones se hicieron por duplicado.

3.4.3 Determinación de proteína soluble y turbidez

Se determinó la concentración de proteína soluble mediante el ensayo espectrofotométrico de Biuret (Véase Capítulo II, sección 2.2.4) y la turbidez (Véase Capítulo II, sección 2.2.5) en los derivados de queratina obtenidos por los métodos convencionales, de reducción con Na₂S y de hidrólisis con NaOH, y sus modificaciones (carboximetilación y sulfitólisis oxidativa).

3.4.4 Grado de modificación (Determinación de Sulfhidrilos):

El grado de modificación se midió para los derivados de queratina con etapa de modificación incluida (Véase Capítulo II, sección 2.2.6) mediante el ensayo de DTNB (Reactivo de Ellman: 5,5'-ditio-bis ácido 2-nitrobenzoico). Con esta determinación se comparó el contenido de grupos libres –SH remanentes tras la modificación (incluyendo la cantidad de enlaces disulfuro presentes) con el contenido de –SH (incluyendo la cantidad de enlaces disulfuro) previo a la modificación. El contenido teórico de grupos –SH y enlaces disulfuro en queratina nativa (basado en la cantidad de residuos presentes de cistina/cisteína) es cerca de 700 μmol grupos cisteína/g queratina (Schrooyen y col., 2001). El grado de modificación se calculó usando la ecuación 2.7 (Véase Capítulo II, sección 2.2.6).

3.4.5 Análisis del comportamiento térmico por Calorimetría diferencial de barrido

Se analizó el comportamiento térmico de las plumas de pollo y los derivados de queratina mediante calorimetría diferencial de barrido (Véase Capítulo II, sección 2.3.3). Las plumas enteras, las barbas, raquis y calamus previamente adecuados

**Capítulo III. Metodologías de solubilización de plumas de pollo
para la obtención de queratina**

y secos, se molieron hasta obtener un polvo fino. Para el análisis de los derivados solubles obtenidos, se trabajó con los productos liofilizados. Las muestras se pasaron con adición de agua (20 %p/p) en recipientes herméticos por 72 h a 25 °C. Se pesaron entre 1-5 mg de las muestras en cápsulas de aluminio que se sellaron herméticamente; como referencia se utilizó una cápsula vacía. Se usó el método estándar con una rampa de calentamiento de 20-300 °C. La velocidad de enfriamiento de 10 °C/min hasta alcanzar 20 °C con isoterma de 2 minutos y la velocidad de calentamiento fue de 10 °C/min hasta 300 °C. Todas las determinaciones se hicieron por duplicado. Después de terminar las corridas, las cápsulas se perforaron sobre la tapa y se llevaron a estufa a 130 °C por 3 h o hasta peso constante.

3.4.6 Espectroscopía Infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros infrarrojos con la transformada de Fourier (FTIR) de los derivados de queratina desarrollados en el presente trabajo fueron obtenidos con un espectrofotómetro IR (Vertex 70, Bruker, Alemania) perteneciente al Centro de Investigación y Desarrollo de Ciencias Aplicadas (CINDECA), se trabajó en un rango de números de onda desde 4000 a 400 cm^{-1} . Para cada muestra se colectaron 60 barridos con una resolución de 4 cm^{-1} que fueron acumulados.

Para generar el promedio correspondiente a cada muestra los datos obtenidos se procesaron utilizando el software OPUS (OPUS, Bruker Optics, USA). Los polvos de los derivados de queratina se trituraron con bromuro de potasio purificado y se comprimió hasta formar una pastilla por la cual se hizo incidir la radiación IR.

3.4.7 Ensayo de solubilidad de los derivados de queratina liofilizados

Se estudió la variación de la solubilidad de los derivados de queratina liofilizados, obtenidos mediante los diferentes procesos de solubilización con y sin etapa de modificación química incluida, en medios acuosos para un rango de pH entre 6 y 9. En soluciones buffer Tris:HCl 0,03 M a pH 6,7,8 y 9, se dispersaron 0,5 g de la queratina en polvo por cada 100 mL de solución buffer. Las dispersiones se agitaron durante 3 h y posteriormente se almacenaron a 25 °C por 2 meses en oscuridad. Se determinó la proteína liberada al medio mediante el método colorimétrico para determinación de proteínas solubles Biuret. Las mediciones se realizaron para los días 0, 3, 5, 8, 10, 15, 20, 30, 45, 60.

Se tomó 0,3 ml de muestra del sobrenadante y se traspasó a un tubo de ensayo al cual se le adicionó 0,2 mL de agua destilada y 2 mL de Reactivo Biuret, se agitó en vortex 30 s, el tiempo de reacción fue de 15 minutos y se leyó a 550 nm. Se construyó la curva de calibración a partir de las absorbancias medidas para concentraciones conocidas de patrón (0 a 2,0 mg de albumina/mL) en el buffer Tris-HCl correspondiente para cada pH.

3.4.8 Análisis estadístico

Se realizó el correspondiente análisis estadístico de varianza mediante ANOVAS con el software Infostat v. 2020 (Grupo InfoStat, FCA, Argentina), las diferencias se compararon mediante la prueba de Tukey usando un nivel de significancia $\alpha=0,05$.

3.5 Resultados y discusión

3.5.1 Caracterización de la materia prima

Las plumas de pollo acondicionadas presentaron una humedad inicial del $3,46 \pm 0,12$ %. El contenido de proteína cruda en las plumas de pollo fue del $89,09 \pm 0,4$ %.

3.5.2 Caracterización de los derivados solubles

La queratina que se puede obtener de las plumas de pollo presenta un alto contenido de enlaces disulfuro y de aminoácidos hidrofóbicos, haciéndola insoluble en agua. Las metodologías de solubilización aplicadas (Figura 3.3) permitieron obtener soluciones de queratina que variaron en sus características físicas como el color y olor, siendo las obtenidas mediante hidrólisis con NaOH las que presentaron menor olor a sulfuros en comparación con las otras 2 metodologías.



Figura 3.3. Soluciones de queratina soluble a partir de plumas de pollo, obtenidas mediante las 3 metodologías de solubilización: a) convencional, b) Reducción con Na_2S y c) Hidrólisis con NaOH.

3.5.2.1 Rendimiento de solubilización

Se analizó el rendimiento de solubilización de las plumas de pollo y el contenido de proteína soluble en las soluciones de queratina obtenidas mediante las

**Capítulo III. Metodologías de solubilización de plumas de pollo
para la obtención de queratina**

metodologías aplicadas: a) convencional, b) Reducción con Na₂S y c) Hidrólisis con NaOH; y las condiciones de proceso aplicadas.

En la tabla 3.1 se presentan los resultados obtenidos para el rendimiento de solubilización de plumas de pollo y proteína soluble.

El rendimiento de solubilización se calculó mediante la ec. 3.1; por otra parte, el contenido de proteína soluble determinado mediante el método de Biuret se expresó en g proteína soluble/ g de pluma sol.

Tabla 3.1 Condiciones de las metodologías de solubilización de plumas aplicadas; rendimiento de solubilización y proteína soluble.

Metodología	Condiciones			Pluma solubilizada (%)*	g proteína soluble/ g de pluma sol.*
	Temp. (°C)	Tiempo (min)	pH		
Red 1	60	60	9	89,21±0,68 ^c	0,273±0,11 ^c
Red 2	40	120	9	83,50±0,37 ^d	0,250±0,02 ^d
H1	60	60	12	94,10±0,10 ^{ab}	0,633±0,04 ^{ab}
H2	40	120	12	93,63±0,31 ^b	0,618±0,01 ^b
2-MEC**	60	60	8,5	95,53±0,22 ^a	0,667±0,02 ^a

*Resultados expresados como el promedio ± desviación estándar de triplicados.

Para cada columna valores con superíndices distintos difieren significativamente según la prueba de Tuckey (p<0.05).

** Metodología convencional de solubilización de plumas mediante agentes reductores aplicando 2-Mercaptoetanol.

La metodología convencional con 2-MEC en las condiciones de temperatura y tiempo aplicadas (60 °C y 60 minutos) presentó los valores más altos de porcentaje de pluma solubilizada; esta metodología ha sido considerada como una de las más eficientes y se han reportado valores de solubilización de diferentes biomasas fuente de queratina. Schrooyen y col., (2000) indicaron una

Capítulo III. Metodologías de solubilización de plumas de pollo para la obtención de queratina

eficiencia del 75 % y Sinkiewicz y col., (2017) un 83 % en la solubilización de plumas de pollo.

La metodología de reducción con Na₂S (Red 1 y Red 2) presentó 83 a 89 % de rendimiento en la solubilización de plumas, estos resultados concuerdan con los reportados por Sharma y col., (2018) con rendimientos de extracción superiores al 80 % cuando aplicaron Na₂S [500 mM] a 50 °C.

La metodología de hidrólisis con NaOH en las condiciones de proceso aplicadas (H1 y H2) presentó valores significativamente mayores de %*Pluma_{sol}* a los obtenidos con la metodología de reducción con Na₂S Red 1 y Red 2 (Tabla 3.1). H1 tuvo el mismo rendimiento ($p > 0,05$) que la metodología convencional con 2-MEC en la solubilización de plumas de pollo.

La hidrólisis H1 presentó el mayor contenido de proteína soluble por gramo de pluma junto con la reducción con 2-MEC ($p > 0,05$; Tabla 3.1), mientras que Red 1 y Red 2 arrojaron los menores valores de proteína soluble de todas las metodologías aplicadas ($p < 0,05$).

Una etapa de solubilización a 60 °C y durante 60 minutos (Red 1 y H1) mejoró el rendimiento de solubilización de plumas y la cantidad de proteína soluble ($p < 0,05$) presente en las soluciones, respecto de la solubilización a 40 °C durante 120 minutos (H2 y Red 2).

Basado en los resultados obtenidos, las metodologías H1 y Red 1 podrían ser empleadas como una opción viable más económica y segura en reemplazo de la metodología convencional que utiliza 2-MEC.

3.5.2.2 Modificación química

La queratina soluble obtenida contiene residuos de cisteína que se pueden volver a oxidar rápidamente tras la etapa de diálisis, debido a la disminución de los agentes reductores. El re-entrecruzamiento entre las cadenas y la reformación de puentes disulfuro (-S-S-), se evidenció por la formación de agregados proteicos durante la etapa de diálisis, siendo necesario incluir una etapa de modificación química.

a) carboximetilación de la queratina:

Para evitar la re-oxidación de los grupos tioles presentes en las soluciones de queratina obtenidas a través de las metodologías Red 1, H1 y 2-MEC y evitar la reformación de los puentes disulfuro tras la diálisis y durante la liofilización, se aplicó una etapa de modificación química mediante la carboximetilación con ácido monocloroacético (MCA) dando como producto *S-Carboximetil-queratina* (SCMQ). El MCA puede reaccionar mediante una sustitución nucleofílica de los grupos tioles a pH entre 7,5-8,5 para formar enlaces estables (Sánchez Ramírez y col., 2019).

Las soluciones de queratina se modificaron con el agregado MCA en dos concentraciones 0,2 y 0,5 % m/v y posteriormente se dializaron. El contenido de grupos -SH libres se evaluarán en los derivados solubles de queratina antes y después de la etapa de modificación mediante la reacción de Ellman y se calculó el grado de modificación. Además, se cuantificó el contenido de proteína soluble de las soluciones obtenidas. Para el ensayo de DTNB, en una primera instancia se determinó el tiempo de reacción del ensayo registrando las absorbancias a $\lambda = 412$ nm cada 5 minutos hasta que alcance un valor constante. En la figura 3.4 se muestra la variación de las absorbancias medidas para las muestras

**Capítulo III. Metodologías de solubilización de plumas de pollo
para la obtención de queratina**

modificadas, en función del tiempo; la reacción se estabilizó para todos los casos después de los 20 minutos. Para los cálculos del contenido de grupos sulfhidrilos libres (-SH) y el grado de modificación se utilizó el valor de absorbancia medido a los 30 minutos.

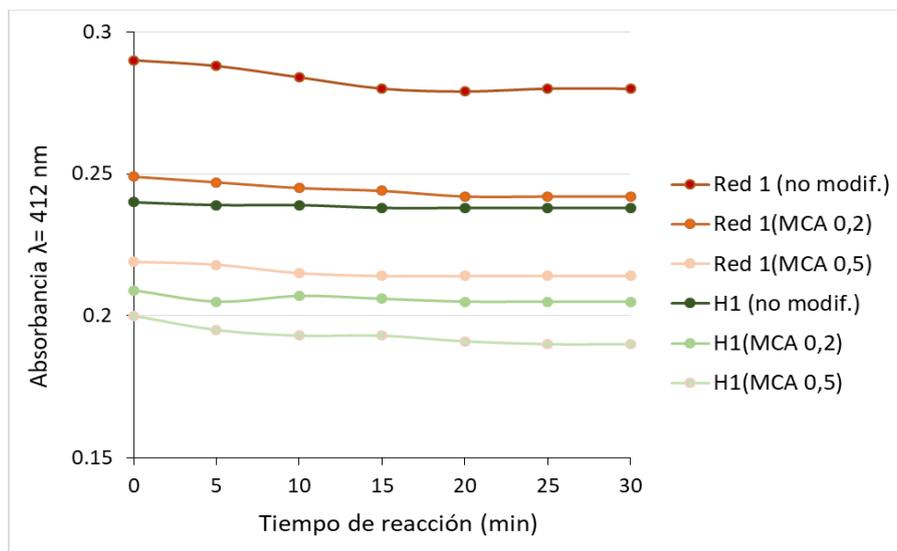


Figura 3.4 Variación de la absorbancia en el tiempo para la reacción de DTNB para las metodologías de reducción con Na_2S e hidrólisis con NaOH .

Es de remarcar que las soluciones de queratina requieren dilución previa a la reacción, este factor debe ser tenido en cuenta para los cálculos correspondientes. La determinación del contenido de sulfhidrilos libres se realizó calculando la concentración molar expresada por mol/L, a partir del despeje de la ecuación simplificada de la Ley de Lambert-Beer (véase Capítulo II; Ec. 2.7) utilizando un valor de $13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ como coeficiente de extinción molar teórico (ϵ) y $b = 1 \text{ cm}$. Para expresar los resultados en $\mu\text{mol -SH} / \text{g}$ de pluma, los resultados de concentración se multiplicaron por el factor de dilución y dividieron por la cantidad de plumas disueltas por litro de solución de queratina. Adicionalmente se calculó el porcentaje de modificación (véase Capítulo II; Ec. 2.8). En la tabla 3.2 se presentan los resultados obtenidos, asimismo el contenido

**Capítulo III. Metodologías de solubilización de plumas de pollo
para la obtención de queratina**

de proteína soluble para las muestras modificadas. La queratina extraída de las plumas de pollo mediante la ruptura de los enlaces disulfuro presentes en la cistina, genera la formación de cisteína que contiene grupos –SH libres. Recordemos que la cistina es un dímero de dos cisteínas unidas por sus grupos funcionales tiol a través de un puente disulfuro. La *cisteína* es un α -aminoácido no esencial cuya *fórmula* química es **HS-CH₂-CHNH₂-COOH**. Se ha reportado que el contenido de cistina presente en las plumas de pollo es de 360 $\mu\text{mol/g}$ pluma, siendo equivalente a 720 $\mu\text{mol/g}$ pluma de contenido de cisteína (Schrooyen y col., 2000; Wrzsniewska-Tosik y Adamiec, 2007). Recordemos que el reactivo Ellman (ácido 5,5'-ditiobis 2-nitrobenzoico) oxida los grupos -SH libres, interaccionando con el grupo tiol para dar ácido tionitrobenzoico en una reacción equimolar para cada residuo de cisteína en una solución estabilizadora de dihidrogenofosfato de sodio. Es una reacción cuantificable que mide el número de cisteína presente en una muestra. Como resultado se obtiene la formación de un complejo amarillo que absorbe luz en la región visible del espectro, con máxima absorción a una longitud de onda de 412 nm. Tras la etapa de solubilización de las plumas de pollo, se determinó que el contenido de –SH libres fue 360 y 352 $\mu\text{mol/g}$ pluma para la queratina obtenida por la metodología Red 1 y H1 respectivamente, indicando que dichas metodologías rompen cerca de un 50 % de los enlaces disulfuro presentes en la queratina de plumas de pollo y evitan la re-formación de los mismos. Wrzsniewska-Tosik y Adamiec, (2007) reportaron el 50 % de ruptura de los enlaces disulfuro en queratina, utilizando soluciones de Na₂S o NaOH 0,1M, lo cual indica que la queratina nativa se modificó significativamente.

**Capítulo III. Metodologías de solubilización de plumas de pollo
para la obtención de queratina**

Con el uso de 2-MEC para la solubilización, la concentración de –SH libres medida fue de 388 $\mu\text{mol/g}$ pluma correspondiente a un 53 %, ligeramente mayor al reportado en Red 1 y H1 ($p > 0,05$; Tabla 3.2). Diferentes autores han reportado el uso de compuestos halógenos como el ácido iodoacético, el ácido iodoaminoacético (Nakata y col., 2015; Schrooyen y col., 2000) y ácido monocloroacético (Wrzsniewska-Tosik y Adamiec, 2007), con el fin de evitar el reentrecruzamiento de las cadenas proteicas debido a la oxidación de los grupos tioles.

La carboximetilación de la queratina mediante el agregado de ácido monocloroacético (MCA) en concentraciones 0,2 y 0,5 % m/v provocó una disminución significativa del contenido de grupos -SH libres ($p < 0,05$; tabla 3.2) independientemente de la metodología de solubilización aplicada. Los resultados obtenidos indicaron que el agregado MCA 0,5 % m/v llevó a una modificación de los grupos –SH libres entre un 18 a 20 %, significativamente mayor ($p < 0,05$) que el 10 al 14 % de modificación logrado con la adición de 0,2 % m/v de MCA. Wrzsniewska-Tosik y Adamiec, (2007) reportaron que con la adición de 4 g/ 1000 cm^3 (0,4 % m/v), lograron modificar efectivamente los grupos sulfhídricos libres presentes en la queratina reducida (cisteína) un 15 % con relación a la queratina sin modificación. Por otro lado, Nakata y col., (2017) indicaron que un proceso de carboximetilación sólo redujo en un 5 % los -SH libres. En cuanto a la concentración de proteína soluble, se observó un aumento en las muestras modificadas con 0,2 y 0,5 % MCA, siendo solo significativo ($p < 0,05$) para Red 1.

Capítulo III. Metodologías de solubilización de plumas de pollo
para la obtención de queratina

Tabla 3.2 Contenido de grupos sulfhídricos libres (SH), porcentaje de modificación de los derivados de queratina y contenido de proteína soluble.

Tratamiento	-SH libres (<i>umol/g pluma</i>)	% Mod.	g proteína soluble/ g de pluma sol.*	Abs $\lambda = 540 \text{ nm}$
<i>Red 1</i> (sin modif.)	360,01±0,67 ^a	-----	0,273±0,11 ^b	1,80 ± 0,01
<i>Red 1</i> (MCA 0,2 % m/v)	309,52±0,61 ^b	13,93 ^b	0,333±0,11 ^{ab}	1,77 ± 0,01
<i>Red 1</i> (MCA 0,5 % m/v)	287,58±0,61 ^c	20,03 ^a	0,373±0,11 ^{ab}	1,42 ± 0,01
<i>H1</i> (sin modif.)	352,92±2,70 ^a	-----	0,633±0,04 ^{ns}	1,35 ± 0,01
<i>H1</i> (MCA 0,2 % m/v)	314,29±2,02 ^b	10,46 ^b	0,647±0,04 ^{ns}	1,38 ± 0,01
<i>H1</i> (MCA 0,5% m/v)	285,67±0,68 ^c	18,61 ^a	0,646±0,04 ^{ns}	1,21 ± 0,01
<i>2-MEC</i> (sin modif.)	388,69±3,37 ^a	-----	0,667±0,02 ^a	-----
<i>2-MEC</i> (MCA 0,2 % m/v)	347,20±1,35 ^b	11,22 ^b	0,681±0,01 ^{ns}	-----
<i>2-MEC</i> (MCA 0,5% m/v)	320,01±3,35 ^c	18,17 ^a	0,699±0,01 ^{ns}	-----

*Resultados expresados como el promedio ± desviación estándar de triplicados. Para cada columna, los valores con superíndices distintos difieren significativamente por tratamiento según la prueba de Tuckey ($p < 0.05$). ^{ns} Sin diferencias significativas.

b) Sulfitólisis oxidativa

Se logró una re-oxidación parcial de las fracciones de cistina/cisteína, obteniendo productos más inodoros y blanquecinos, con la presencia de algunos agregados. No fue posible determinar el contenido de sulfhidrilos libres mediante la reacción del reactivo de Ellman en las muestras modificadas

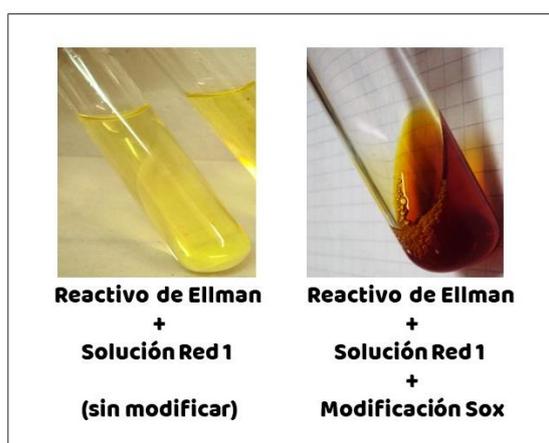


Figura 3.5 Reacción de Ellman y soluciones de queratina

**Capítulo III. Metodologías de solubilización de plumas de pollo
para la obtención de queratina**

por sulfitólisis, ya que se presentaron interferencias en la medición, visualizadas como una coloración roja intensa (figura 3.5). Esta interferencia podría deberse a que los productos formados por el proceso de re-oxidación parcial son diferentes, obteniéndose principalmente ácido cisteico. Por otro lado, se observó que en la etapa de modificación hubo un descenso significativo ($p < 0,05$) en el contenido de proteína soluble cuando se utilizó el método de sulfitólisis oxidativa en comparación con la modificación por carboximetilación de la queratina a diferentes concentraciones.

La turbidez de los derivados solubles de queratina medida en absorbancia a $\lambda = 540$ nm se presentan en la Tabla 3.3. Los derivados solubles obtenidos a partir de la metodología de reducción con sulfuro de sodio (Red 1), presentaron mayor turbidez en comparación a los obtenidos mediante hidrólisis con hidróxido de sodio (H1). Esta tendencia pudo deberse al pH de los procesos de solubilización (Red 1, pH= 9-10; H1, pH= 12-14), ya que a medida que el pH disminuye y se acerca al punto isoeléctrico (pH 4,2), aumenta la cantidad de agregados de proteína formados. Se observó una disminución de la turbidez en las soluciones tratadas con sulfitólisis oxidativa (Sox), presentándose a su vez, un menor contenido de proteína soluble. Los resultados anteriores concuerdan con lo sugerido por Tonin y col., (2010), donde las altas concentraciones de proteína promueven la agregación de las cadenas polipeptídicas de las proteínas, aumentando la turbidez de la solución. En el caso de los derivados obtenidos mediante la metodología convencional con 2-MEC con y sin modificaciones, los valores de turbidez no fueron determinados debido a que al finalizar la etapa de diálisis se forma un gel blanquecino (2-MEC sin modificar) o aglomerados proteicos de gran tamaño (2-MEC modificados).

3.5.3 Obtención de queratina en polvo

Se logró obtener queratina en polvo a partir de plumas de pollo, tras una etapa de solubilización/modificación química, diálisis y secado por liofilización (figura 3.6).

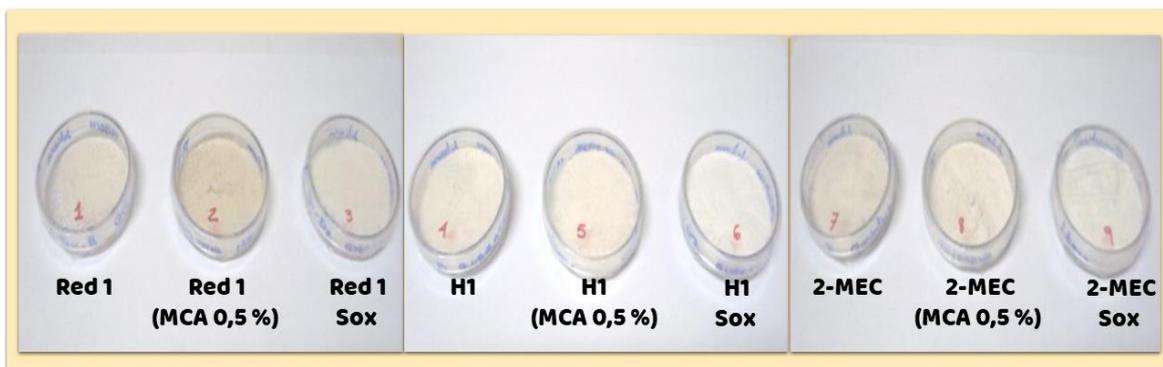


Figura 3.6. Derivados de queratina en polvo obtenidos mediante secado por liofilización.

Se evaluó la solubilidad inicial de las diferentes muestras de queratina en polvo obtenidas a pH 7, 8, 9 en medio acuoso y temperatura ambiente (25 °C) mediante la medición de proteína soluble; posteriormente se almacenaron las muestras durante 60 días y se realizó el seguimiento de la variación de la solubilidad.

En la figura 3.7 se presentan los gráficos de evolución de la solubilidad a diferentes valores de pH; para todas las muestras analizadas obtenidas por reducción (Red 1, Red 1 MCA 0,5 %, Red a Sox), por hidrólisis (H1, H1 MCA 0,5 % y H1 Sox), inclusive el control con mercaptoetanol, se observó que la solubilidad de los polvos de queratina a pH 7-9 fue baja, representando menos del 15 % de proteína soluble en el medio acuoso, se observa que a medida que aumenta el pH se incrementa la solubilidad del derivado.

Capítulo III. Metodologías de solubilización de plumas de pollo para la obtención de queratina

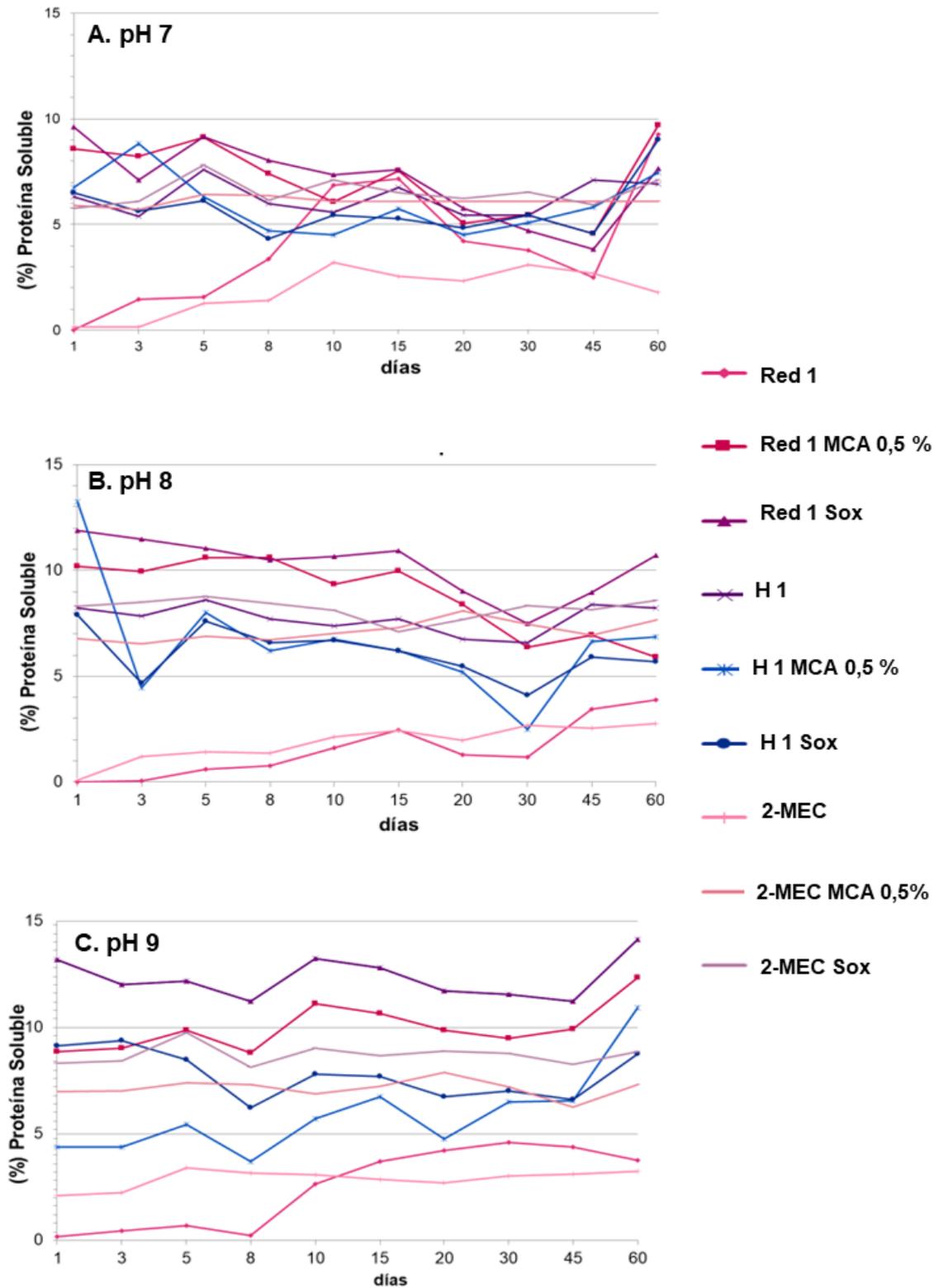


Figura 3.7. Efecto del pH (7, 8, 9) en la solubilidad de los diferentes derivados de queratina en polvo a 25 °C, durante 60 días de almacenamiento. Medido como proteína soluble en medio acuoso mediante el método de Biuret.

3.5.4 Análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se analizó el comportamiento térmico de las plumas y de los derivados de queratina en polvo mediante la técnica de calorimetría diferencial de barrido según lo indicado en el capítulo II (sección 2.3.3).

Debido a la heterogeneidad de la biomasa se propuso analizar las fracciones individuales de la pluma y sus fracciones principales que conforman las plumas de pollo (*Raquis, Barbas y Calamus*), para este experimento se procedió a dividir manualmente las plumas lavadas y secas obteniendo las fracciones de raquis (R), barbas (B) y calamus (C). Cada fracción se molió hasta obtener un polvo fino y se resuspendió con agua Milli-Q (20 %m/v) hasta formar una pasta y se dejó estabilizar durante 72 h a 25 °C en un recipiente hermético. En la figura 3.8 se presentan los termogramas de calentamiento de las fracciones individuales de las plumas de pollo.

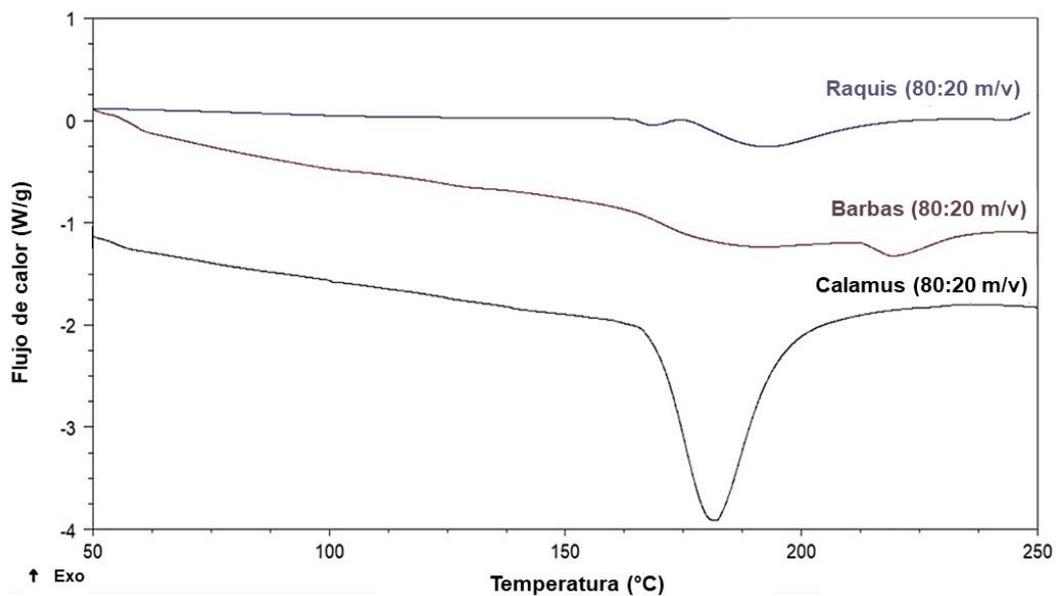


Figura 3.8. Termograma de calentamiento obtenidos mediante calorimetría diferencial de barrido de las fracciones de la pluma en condiciones de humedad al 20 % (b.h).

**Capítulo III. Metodologías de solubilización de plumas de pollo
para la obtención de queratina**

Se observa un pico endotérmico correspondiente a la desnaturalización térmica de la fracción de Calamus ($T_p = 181\text{ °C}$ y $\Delta H = 228,8\text{ J/g}$), en cuanto a las fracciones de Raquis y Barbas el proceso de desnaturalización se observa a valores mayores de T_p $190,66\text{ °C}$ y $193,13\text{ °C}$, respectivamente; sin embargo, los picos son menos pronunciados indicando una menor entalpía de desnaturalización ($\Delta H_{(\text{Raquis})} = 34,70\text{ J/g}$ y $\Delta H_{(\text{Barbas})} = 79,37\text{ J/g}$). En el termograma del raquis y se observa adicionalmente con un hombro contiguo a $219,85\text{ °C}$.

Takahashi y col., (2004) estudiaron el comportamiento térmico para las diferentes fracciones de las plumas de pollo en condiciones secas y húmedas; reportaron 2 picos endotérmicos (pico 1 entre 122 °C (Calamus) a 127 °C (Barbas); pico 2 140 °C (Barbas) a 148 °C (Calamus)) con diferentes temperaturas de desnaturalización.

La variabilidad observada tanto en la temperatura de desnaturalización como en la entalpía asociada al proceso puede ser explicadas por las diferencias en la estructura morfológica como el ordenamiento molecular y empaquetamiento y no por diferencias en la molécula de proteína en si misma (Takahashi y col., 2004).

Tesfaye y col., (2018) reportaron 3 picos endotérmicos en los termogramas de calentamiento para las diferentes fracciones de las plumas; el primer pico ($T_p = 43\text{--}145\text{ °C}$) y correspondiente al agua ligada presente en la queratina. Debido a la presencia de puentes hidrógeno entre las moléculas de agua y la estructura de la queratina, se requiere exceder los 100 °C para evaporar dicha agua (Tesfaye y col., 2018). Un segundo pico asociado a la degradación parcial de las fracciones de las plumas con valores de T_p entre $230\text{--}275\text{ °C}$, mayores a las encontradas en la presente investigación; esta variación puede deberse a la diferencia de humedades de las muestras estudiadas.

**Capítulo III. Metodologías de solubilización de plumas de pollo
para la obtención de queratina**

Finalmente, el pico 3 a 280-340 °C vinculado con la degradación térmica de los enlaces disulfuro y a la degradación de las estructuras helicoidales presentes en las plumas de pollo (Monteiro y col., 2005).

En la tabla 3.3 se presentan los valores de las temperaturas para cada polvo de queratina analizado. El análisis calorimétrico de los derivados de queratina en polvo indicó que todos los productos obtenidos presentan alta estabilidad térmica, con la presencia de transiciones térmicas mayores a 150 °C.

Tabla 3.3 Valores de temperatura y entalpía de las transiciones térmicas para los diferentes derivados de queratina obtenidos a partir de plumas de pollo.

Tratamiento Na₂S	Tp (°C)	Tratamiento NaOH	Tp (°C)
Sin modificar	205,5	Sin modificar	205,31
MCA 0,5%	110,14	MCA 0,5%	200,28
Sox	118,79	Sox	199,88

En la figura 3.9.I) se presentan los termogramas de los derivados de queratina reducida obtenidos mediante la metodología de solubilización de plumas completas con Na₂S, con y sin modificación química. La queratina en polvo reducida (Red 1; Figura 3.9.I) a) presentó una transición térmica a 205,51 °C con una entalpía de 120,3 J/g.

**Capítulo III. Metodologías de solubilización de plumas de pollo
para la obtención de queratina**

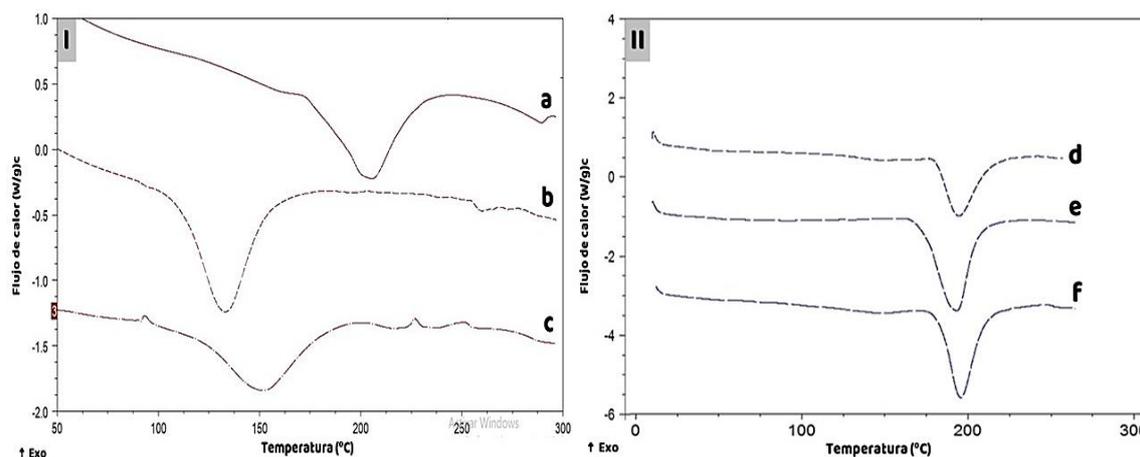


Figura 3.9. Termogramas de calentamiento de los derivados de queratina obtenidos por reducción con Na_2S 0,1M. I) A partir de la pluma completa: a) sin modificar, b) MCA 0,5 % y c) Sox. II) A partir del Calamus: d) sin modificar, e) MCA 0,5 % y f) Sox.

Las modificaciones químicas aplicadas se reflejan en una disminución de la temperatura de pico de un 46,4 % para MCA 0,5 % ($T_p = 110,14$ °C) y de 43,18 % para Sox; debida posiblemente al reordenamiento de la estructura de la queratina y a la variación de la biomasa de partida.

Esto último puede ser comprobado mediante la comparación entre la solubilización y modificación de queratina a partir de plumas y la obtenida a partir de una sola fracción. El calamus fue sometido a la solubilización mediante reducción Na_2S bajo las condiciones seleccionadas en la sección 3.2.1, disminuyendo así la variabilidad de la muestra. Diferentes autores (Shavadi y col., 2017; Sharma y col., 2016; Takahashi y col., 2004; Tesfaye y col., 2018); han indicado que la estructura de la queratina varía dependiendo de la biomasa de partida, incluso de las fracciones que la forman. En los termogramas de la figura 2.17 II, se observa que las transiciones térmicas de los derivados proteicos

**Capítulo III. Metodologías de solubilización de plumas de pollo
para la obtención de queratina**

sin modificar y modificados están entre 195-200 °C y no varían significativamente.

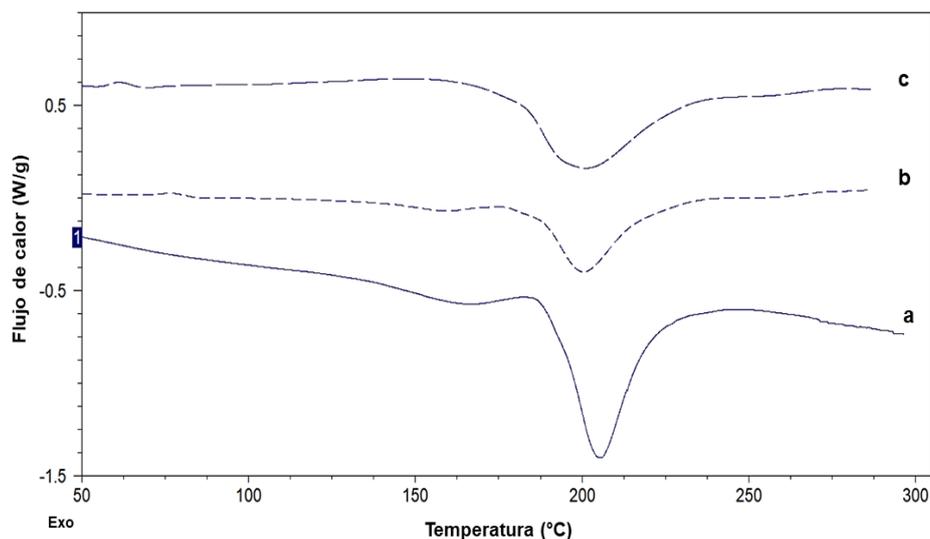


Figura 3.10. Termogramas de calentamiento de los derivados de queratina obtenidos por hidrólisis con NaOH. a) sin modificar, b) MCA 0,5% y c) Sox.

3.5.5 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

Con el fin de entender la estructura química de los derivados proteicos obtenidos a partir de las plumas de pollo, se utilizó la metodología de análisis por FTIR. En las figuras 3.12 y 3.13 se presentan los espectros FTIR correspondientes a los derivados de queratina reducida con Na₂S (0,1M) sin modificación y modificados. En la región del espectro comprendida entre 3500 a 2500 cm⁻¹, las bandas cercanas a 3300 cm⁻¹ (3312 cm⁻¹; Figura 3.12) corresponden a la *Amida A*, esta banda de absorción se asocia principalmente con las vibraciones de estiramiento de los enlaces de hidrógeno en los grupos funcionales O-H y N-H presentes en los enlaces peptídicos (Aluigi y col., 2007; Ma y col. 2016). Asimismo, han sido asociadas con las regiones ordenadas en la estructura alfa hélice de la proteína y corresponde al modo de vibración simétrico $\nu(\text{NH})$ (Akhtar y Edwards, 1997).

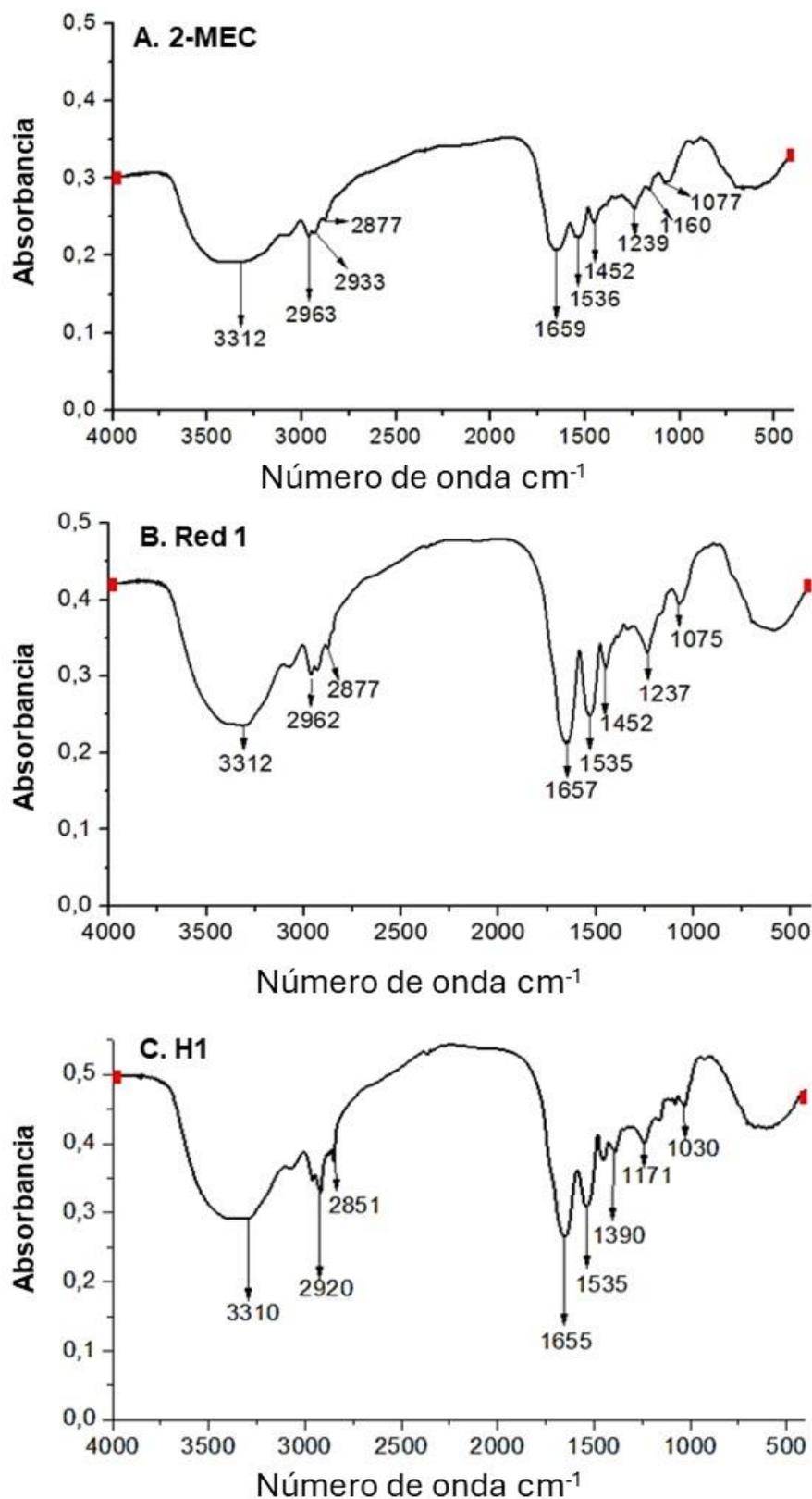


Figura 3.12. Espectros FTIR de los derivados de queratina en polvo A. 2-MEC, B. Red1 y C. H1; rango de número de onda entre 4000 a 400 cm⁻¹.

Capítulo III. Metodologías de solubilización de plumas de pollo para la obtención de queratina

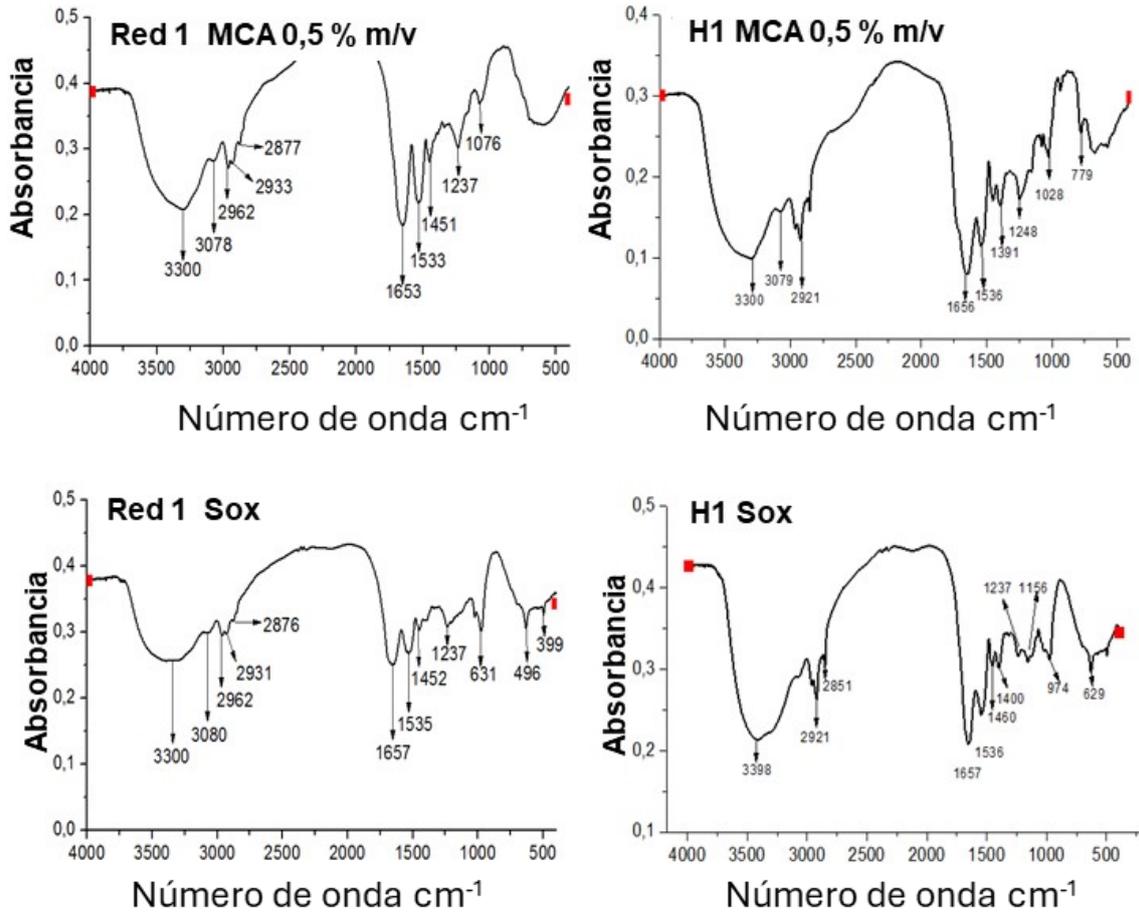


Figura 3.13. Espectros FTIR de los derivados de queratina modificados en polvo, rango de número de onda entre 4000 a 400 cm^{-1} .

Además, se observaron señales en las regiones onda 3080-3078 cm^{-1} en las muestras modificadas químicamente (figura 3.13), asociadas a la vibración asimétrica del grupo N-H ($\nu_{\text{as}}\text{NH}$), también denominada por algunos autores como Amida B (Wojciechowska y col., 1999; Martínez-Hernández y col., 2005). En el rango 3100-2700 cm^{-1} se ha asignado como característico de los aminoácidos iónicos dipolares $\text{RCH}(\text{NH}_3^+)\text{COO}^-$, el catión NH_3^+ corresponde a varias bandas para dicho rango con modos vibracionales de estiramiento simétricos ($\nu(\text{NH})$) y asimétricos ($\nu_{\text{as}}(\text{NH})$) (Martínez-Hernández y Velasco-Santos, 2005). La señal observada 2962 cm^{-1} (figura 3.12 y 3.13) puede ser

Capítulo III. Metodologías de solubilización de plumas de pollo para la obtención de queratina

asignada a la vibración asimétrica ($\nu_a(\text{CH}_3)$) (Edwards y col., 1998) y a 2933-2930 cm^{-1} con la vibración simétrica ($\nu(\text{CH}_3)$) (Martínez-Hernández, y col., 2005).

En la región 1700 a 400 cm^{-1} , se encuentran las señales a números de onda de 1633, 1559 y 1392 cm^{-1} correspondientes a los enlaces peptídicos identificados como las *Amidas I, II y III* respectivamente, que proporcionan información importante sobre la estructura de la queratina y las posibles alteraciones en el esqueleto de está (Alashwal y col., 2019).

La *Amida I* es una combinación de las estructuras α -hélice y hoja β -plana. Wojciechowska y col., (1999) indicaron que la banda *Amida I* está relacionada con las vibraciones de $\nu(\text{C}=\text{O})$ y puede ser encontrada en la región de 1600 a 1690 cm^{-1} . En los espectros de *Red 1* y *Red 1 (Sox)* esta banda se observó a 1657 cm^{-1} y 1653 cm^{-1} en el espectro red 1 (MCA 0,5 %). Martínez-Hernández, y col. (2005) que reportaron una fuerte banda a 1652 cm^{-1} relacionada con la vibración de la banda $\nu(\text{C}=\text{O})$ con conformación α -hélice, mientras que una señal detectada a 1666 cm^{-1} correspondería a $\nu(\text{C}=\text{O})$ con conformación hoja β -plana. La banda *Amida II* (1580-1480 cm^{-1}) está relacionada con la flexión del $\delta(\text{N-H})$ y el estiramiento del enlace $\nu(\text{C-H})$ (Martínez-Hernández y Velasco-Santos, 2005; Sharma y col., 2017); para los derivados de queratina *Red 1* con y sin modificación química, el pico de la *Amida II* se presentó a 1533-1535 cm^{-1} . La señal a 1452 cm^{-1} corresponde a la flexión de $\delta(\text{C-H}_2)$ y $\delta(\text{C-H}_3)$ (Akhtar y col., 1997).

La banda débil entre 1300 y 1220 cm^{-1} se asocia a la *Amida III*, la cual se deriva del estiramiento simétrico $\nu(\text{C-N})$ y la flexión de $\delta(\text{CH})$ (Alashwal y col., 2019). Martínez-Hernández y Velasco-Santos (2005) reportaron que la región entre 1230-1240 cm^{-1} puede ser asignada a la estructura de hoja β -plana de la amida

**Capítulo III. Metodologías de solubilización de plumas de pollo
para la obtención de queratina**

III; esta banda se observó para los derivados de queratina a 1237 cm^{-1} puede ser asignada a la Amida III; mientras la banda cercana a 1174 cm^{-1} resulta de la vibración simétrica de $\nu(\text{C-C})$ y corresponde con aminoácidos de cadena lateral. En los espectros *Red 1* (figura 3.12) y *Red 1 (MCA 0,5 %)* (Figura 3.13) se observa una señal a 1076 cm^{-1} , esta señal se encuentra en la región correspondiente a la vibración $\nu(\text{C-C})$ del esqueleto ($1150\text{--}1050\text{ cm}^{-1}$) (Martínez-Hernández y Velasco-Santos, 2005). Estas señales podrían estar asociadas a la oxidación de la cistina, Barton, (2011) reportó que el estiramiento simétrico y asimétrico del ácido cisteico se asocia a 1171 y 1040 cm^{-1} , el dióxido de cistina (1121 cm^{-1}) y el monóxido de cistina (1071 cm^{-1}).

En el espectro *Red 1 (Sox)* modificado por sulfitólisis oxidativa se observan señales en la región $730\text{--}400\text{ cm}^{-1}$; las señales próximas a $730\text{--}620\text{ cm}^{-1}$ corresponden a la vibración simétrica de $\nu(\text{C-S})$ de los alquitioles originados a partir de la cistina (Edwards y col., 1998; Martínez-Hernández y col., 2005). La señal observada a 496 cm^{-1} ha sido previamente reportada por Edwards y col., (1998), quienes la asociaron con la vibración simétrica $\nu(\text{S-S})$.

La presencia de las bandas previamente nombradas permite confirmar que los productos obtenidos a partir de plumas son derivados que conservan la estructura de la queratina.

3.6 PARTE B: Metodologías escalables para la obtención de queratina a partir de plumas de pollo

Con el fin de lograr un proceso de obtención de queratina que sea viable, económico y de fácil implementación, se propuso modificar los protocolos de obtención de queratina mediante hidrólisis aplicando hidróxido de sodio y reducción con sulfuro de sodio, previamente estudiados; se variaron las condiciones del proceso de extracción tales como concentración de los agentes desnaturalizantes, temperaturas y tiempos de reacción; asimismo, se reemplazó la etapa de diálisis por una fase de precipitaciones/lavados y tiempos de reposo que se repite en varias ocasiones. La diálisis es un proceso costoso y especializado que limitaría el volumen de producción aumentando los costos y dificultando el escalado del proceso. La proteína obtenida mediante los siguientes procesos propuestos se puede destinar a usos ambientales, agrícolas y el diseño de nuevos materiales eco-compatibles, ofreciendo una alternativa a la revalorización de los residuos de la cadena productiva avícola.

3.6.1 Condiciones de solubilización de plumas de pollo

Hidrólisis alcalina con hidróxido de sodio: Se disolvieron 5 g de plumas de pollo previamente acondicionadas en 100 mL de solución de NaOH con diferentes concentraciones (0,5, 1, 2, 3, 4 y 5 % m/v) manteniendo el pH entre 11-12. La solubilización se llevó a cabo aplicando diferentes condiciones temperatura/tiempo: **a)** 60 °C y 1 h; **b)** 40 °C y 2 h; **c)** 30 °C y 6 h; **d)** 20 °C y 24 h.

Reducción con sulfuro de sodio:

Se aplicaron los siguientes protocolos.

Q(a): las plumas previamente acondicionadas fueron solubilizadas adicionando una solución de Na_2S $C_{\text{sol}} = 7,8$ g/L en relación de 5 g de pluma / 1 g de Na_2S , la mezcla se calentó a 60°C y se agitó durante 1 h.

Q(b): las plumas fueron tratadas con una solución de concentración $C_{\text{so}} = 10$ g/L y calentadas a 30°C a 3, 6 y 24 h, manteniendo la relación de 10 g de plumas/ g de Na_2S , este protocolo se basa en el previamente propuesto por Poole y col., (2015).

En ambos casos el rango de pH durante la reacción fue ajustado a valores entre 9-10.

Fase de precipitación y lavado

Todas las dispersiones de queratina obtenidas mediante cada proceso se filtraron con lienzo para retirar la biomasa sin disolver.

A continuación, se ajustó el pH a 4,2 usando ácido clorhídrico (HCl ; 2 N) con el fin de precipitar la queratina; dicho valor de pH corresponde al punto isoelectrico de la proteína. Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm y 10°C durante 10 minutos en una centrífuga Rolco CM 2036 (Buenos Aires, Argentina). Los pellets fueron re-suspendidos en agua destilada, agitados a 150 rpm por 10 minutos y nuevamente centrifugados, el proceso se repitió 3 veces con cambios de agua destilada con el fin de lavar la queratina obtenida.

Finalmente, la queratina se congeló a -40°C y se secó por liofilización en un equipo HETO Modelo FD 4. Los polvos de queratina obtenidos se almacenaron en recipientes ámbar herméticos a 4°C .

3.6.2 Resultados y discusión

La aplicación de hidrólisis química ya sea ácida o básica, conlleva a la destrucción de la estructura nativa de la queratina y las plumas se vuelven más solubles en agua. La hidrólisis ácida es más eficiente, pero causa pérdida de algunos aminoácidos como el triptófano (Zhang y col., 2013), mientras que la hidrólisis alcalina es más lenta y suele ser incompleta, proporcionando una menor pérdida de aminoácidos.

Se escogieron las metodologías de solubilización por hidrólisis alcalina con hidróxido de sodio (NaOH) y de reducción con sulfuro de sodio (Na₂S), manteniendo los valores de pH > 9; ya que en los estudios previos se puso a punto cada tipo de extracción.

En ambas metodologías propuestas se reemplazó la etapa de diálisis por ciclos de precipitaciones/lavados con agua destilada, aprovechando la característica de insolubilidad en agua de la queratina precipitada y con el fin de retirar el exceso de reactivos remanentes tras la etapa de solubilización. Estos ciclos de precipitación/lavado se repitieron hasta 3 veces.

Se obtuvo para cada extracción aplicada queratina en polvo, caracterizada por ser un polvo fluido y con poco olor a sulfuro.

En la figura 3.14 se presenta el esquema de las etapas del proceso de obtención de queratina mediante hidrólisis con diferentes concentraciones del agente desnaturalizante NaOH, a 60°C durante 1 h.

Capítulo III. Metodologías de solubilización de plumas de pollo para la obtención de queratina

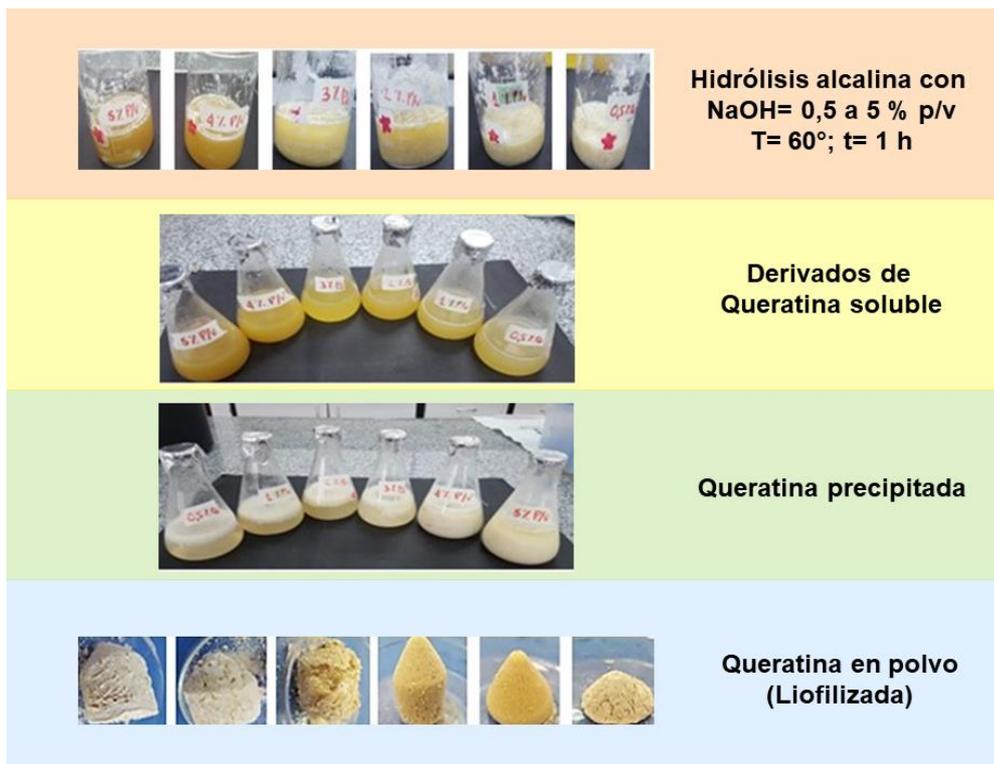
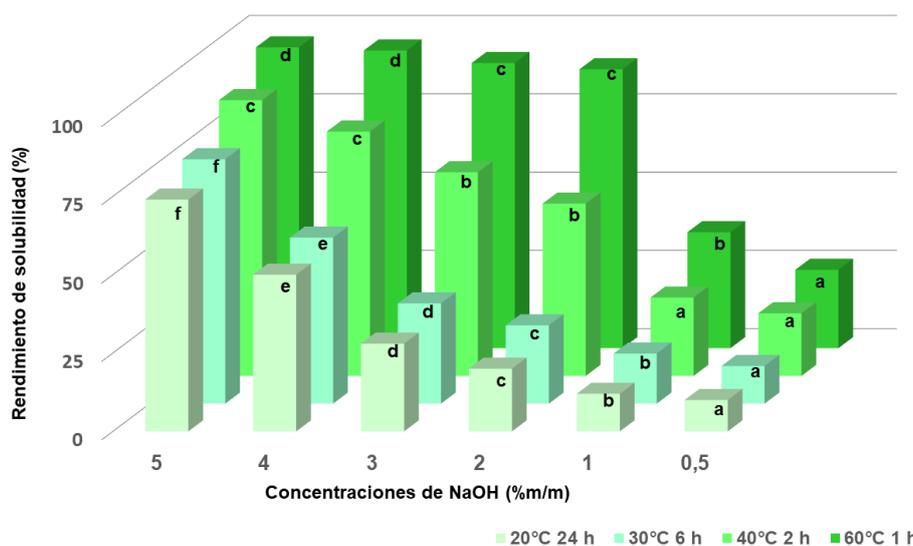


Figura 3.14. Esquema del proceso de obtención de queratina mediante hidrólisis alcalina con hidróxido de sodio.

Se analizó el rendimiento de solubilización de las plumas de pollo mediante hidrólisis con NaOH y las diferentes condiciones de proceso aplicadas. Los valores más altos de % **Sol_{pluma}** se obtuvieron cuando se aplicó mayor temperatura y menor tiempo de reacción (a) 60 °C y 1 h y (b) 40 °C y 2 h). En el caso (a) con concentraciones de NaOH de 4-5 %m/v el rendimiento fue de 95-96 % ($p>0,05$), para NaOH 2-3 %p/p fue de 88 y 91 % **Sol_{pluma}** respectivamente ($p>0,05$) y se observó un descenso significativo ($p<0,05$) del 68 % en el rendimiento del proceso cuando se emplean concentraciones inferiores al 2 % NaOH. Una tendencia similar se presentó en los otros casos, indicando que el efecto de la concentración del reactivo fue preponderante sobre la modificación de temperatura y tiempo de reacción aplicadas (Figura 3.15).

**Capítulo III. Metodologías de solubilización de plumas de pollo
para la obtención de queratina**

Estos resultados concuerdan con los reportados por Sinkiewicz y col., (2017), quienes indicaron un descenso del rendimiento de 93 a 29 % con la disminución de la concentración de NaOH (2,5-1,0 % m/m) a 70 °C y 75 min. La disminución de la temperatura del proceso, aunque se aumentó el tiempo de reacción condujo al descenso en los rendimientos de solubilización, siendo significativo ($p < 0,05$) cuando el proceso de extracción se lleva a cabo a c) 30 °C, 6 h o d) 20 °C, 24 h.



Para cada tratamiento, las columnas con letras (a,b,c,d) distintas difieren significativamente según la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

Figura 3.15 Rendimiento de solubilización de plumas de pollo mediante hidrólisis alcalina con diferentes concentraciones de NaOH. Condiciones de proceso: a) 60 °C y 1 h; b) 40 °C y 2 h; c) 30 °C y 6 h; d) 20 °C y 24 h.

Schrooyen y col., (2000), reportaron para la solubilización de plumas con 2-MEC valores de solubilización de 75 %; Sinkiewicz y col., (2017) reportaron un rendimiento del 83 % para extracciones de queratina de plumas de pollo usando 2-MEC, 82,4 % con bisulfito de sodio y 77,6 % con DTT cuando se aplican condiciones de proceso de 50 °C y 2 h. Por otra parte, se analizó la variación del contenido de proteína soluble en las dispersiones de queratina obtenidas (figura 3.16).

Capítulo III. Metodologías de solubilización de plumas de pollo para la obtención de queratina

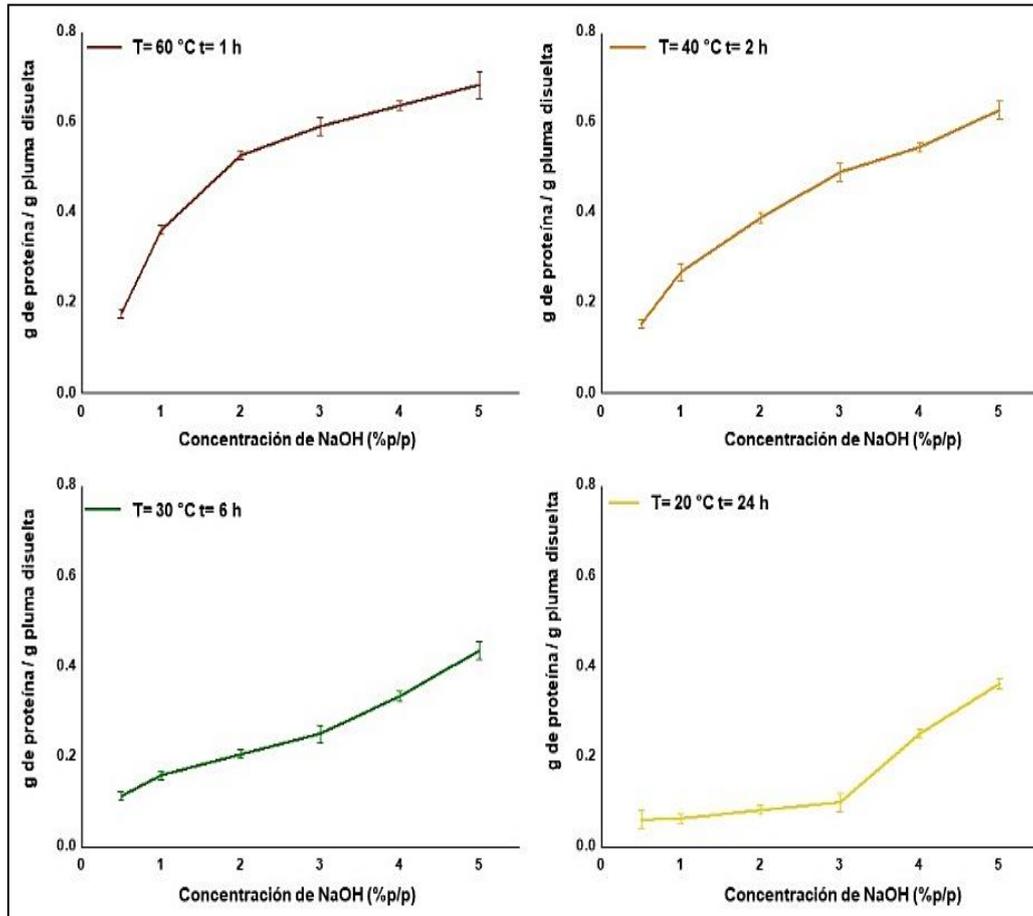


Figura 3.16. Proteína soluble de las dispersiones de queratina obtenidas mediante hidrólisis alcalina con diferentes relaciones de temperatura y tiempo de reacción.

El incremento en el contenido de proteína soluble presente en las dispersiones de queratina como ya se mencionó está directamente vinculado con el aumento de la concentración del NaOH; asimismo, dichos valores fueron significativamente ($p < 0,05$) mayores para procesos que aplican temperaturas más altas y tiempos menores de reacción. Estos resultados se corresponden con el rendimiento de solubilización, pero además indican que las condiciones aplicadas no generan la formación de agregados proteicos.

En el análisis de los protocolos de extracción con sulfuro de sodio (Na_2S) Q(a) y Q(b), se encontró que la aplicación del método Q(a) permite lograr el mayor

**Capítulo III. Metodologías de solubilización de plumas de pollo
para la obtención de queratina**

rendimiento de solubilización de la biomasa, representando un 89 % y a su vez el contenido más alto de proteína soluble (0,25 g proteína soluble/g pluma); por otra parte, el método Q(b) que el conlleva a menores rendimientos, se observó que un proceso de solubilización de 3 h solubiliza en un 50 % la biomasa de partida; con el aumento del tiempo de reacción a 24 h se logró hasta un 66 % de solubilización y 0,22 g proteína soluble/g pluma. En la tabla 3.5 se presentan los resultados de rendimiento de solubilización de plumas de pollo y proteína soluble.

Tabla 3.5. Rendimiento de solubilización de plumas y proteína soluble en dispersiones de queratina obtenidas por reducción con Na₂S.

Metodología	Condiciones			Pluma solubilizada (%)*	Proteína soluble g proteína soluble/ g de pluma *
	Temp. (°C)	Tiempo (h)	Ratio		
Q(a)	60	1	5:1	89,21±0,68 ^a	0,253±0,01 ^a
Q(b)3h	30	3	10:1	49,78±0,47 ^d	0,181±0,02 ^d
Q(b)12h	30	12	10:1	57,50±0,37 ^c	0,205±0,02 ^c
Q(b)24h	30	24	10:1	66,12±0,27 ^b	0,222±0,02 ^b

*Resultados expresados como el promedio ± desviación estándar de triplicados. Para cada columna valores con superíndices distintos difieren significativamente según la prueba de Tuckey (p<0,05).

Estos resultados concuerdan con los reportados por Sharma y col., (2018) con rendimientos de extracción superiores al 80 % cuando aplicaron Na₂S [500 mM] a 50 °C. Varios autores han reportado el eficiente uso del método de reducción empleando como agente reductor al sulfuro de sodio (Na₂S) en condiciones alcalinas. Wrześniewska-Tosik y Adamiec (2008) solubilizaron las plumas de pollo y extrajeron queratina aplicando la reducción con Na₂S 0,1M y variando la temperatura entre 40 y 60 °C con un tiempo de reacción de 1 h. Sharma y col.,

**Capítulo III. Metodologías de solubilización de plumas de pollo
para la obtención de queratina**

(2018) usaron Na₂S [500 mM] a 50 °C y durante 6 h, reportando rendimientos de extracción superiores al 80 %.

El uso de agentes desnaturalizantes como NaOH y Na₂S es una alternativa al proceso de obtención de queratina soluble a partir de la biomasa de plumas de pollo, alcanzándose un rendimiento del 96 % y 0,68 g de queratina/g de pluma en 1 h de proceso cuando se aplica una temperatura de 60 °C y concentración entre un 5-4 % NaOH %m/m; y hasta un 89 % cuando se aplica Na₂S 7,8 g/L en las mismas condiciones de temperatura y tiempo. En comparación con la metodología convencional que aplica como agente reductor 2-MEC con eficiencias de solubilización de plumas de pollo reportadas del 75 % (Schrooyen y col., 2000) y un 83 % (Sinkiewicz y col., (2017)), las metodologías podrían ser empleadas como una opción viable más económica, aplicando procesos más amigables con el ambiente en contraste con la metodología convencional que utiliza 2-MEC, y evitando el uso del proceso de diálisis.

**3.6.2.1 Análisis de la microestructura de los derivados de queratina
obtenidos mediante las metodologías modificadas**

Con el fin de analizar la microestructura de las plumas de pollo y de la queratina en polvo obtenida mediante hidrólisis alcalina con NaOH, se utilizó la metodología de análisis por FTIR-ATR. En la figura 3.17 se presenta el espectro FTIR-ATR de las plumas de pollo acondicionadas, en el cual se observa la banda Amida A (3312 cm⁻¹) que ha sido asociada con las regiones ordenadas en la estructura alfa hélice de la proteína y corresponde al modo de vibración simétrico $\nu(\text{NH})$ (Tesfaye y col., 2017).

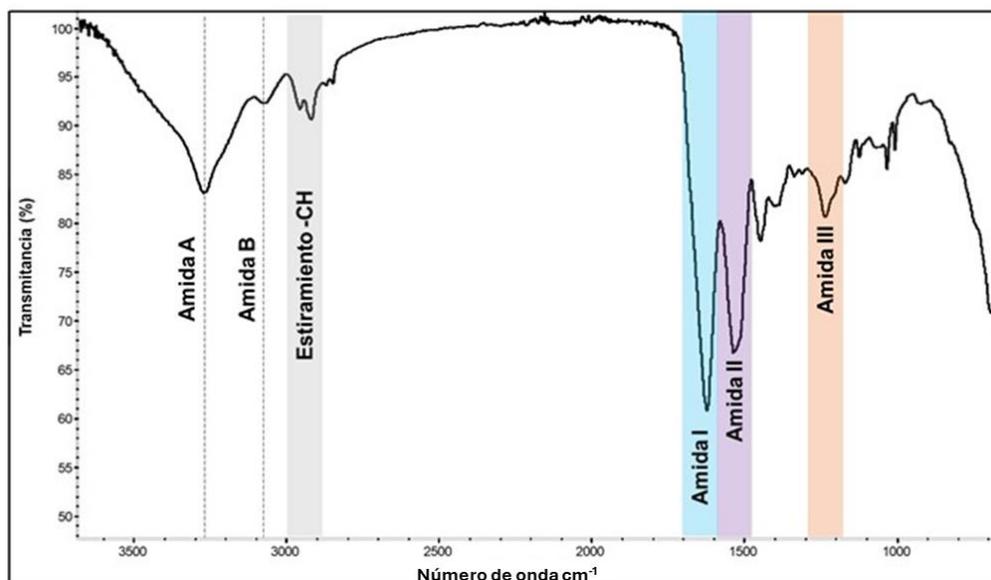


Figura 3.17. Espectros FTIR-ATR A. de plumas de pollo acondicionadas; rango de 4000 a 400 cm^{-1} .

El pico presente en los números de onda 3080-3075 cm^{-1} correspondiente a la banda de Amida B (Martínez-Hernández y col., 2005). En el rango 3100-2700 cm^{-1} ha sido asociado a los aminoácidos iónicos dipolares $\text{RCH}(\text{NH}_3^+)\text{COO}^-$ (Tesfaye y col., 2017), el catión NH_3^+ corresponde a varias bandas para dicho rango con modos vibracionales de estiramiento simétricos ($\nu(\text{NH})$) y asimétricos ($\nu_a(\text{NH})$) (Martínez-Hernández y Velasco-Santos, 2005). El hombro observado a 2960 cm^{-1} corresponde a la vibración asimétrica ($\nu_a(\text{CH}_3)$) (Tesfaye y col., 2017). En la región 1700 a 400 cm^{-1} se encontraron las bandas correspondientes a los enlaces peptídicos identificados como las Amidas I, II y III, en las longitudes de onda de 1632, 1530 y 1239 cm^{-1} respectivamente (Figura 3.17). Estas bandas proporcionan información importante sobre la conformación de la estructura de la queratina presente en las plumas de pollo. La Amida I (1600 a 1690 cm^{-1}) es una combinación de las estructuras α -hélice y hoja β -plana y está relacionada con las vibraciones de $\nu(\text{C}=\text{O})$. La Amida II (1580-1480 cm^{-1}) está relacionada

**Capítulo III. Metodologías de solubilización de plumas de pollo
para la obtención de queratina**

con la flexión del $\delta(\text{N-H})$ y el estiramiento del enlace $\nu(\text{C-H})$ (Martínez-Hernández y Velasco-Santos, 2005; Sharma y col., 2017). La Amida III (1300 y 1220 cm^{-1}) se deriva del estiramiento simétrico $\nu(\text{C-N})$ y la flexión de $\delta(\text{CH})$, la región entre 1230 - 1240 cm^{-1} puede ser asignada a la estructura de hoja β -plana de la Amida III (Martínez-Hernández y Velasco-Santos 2005). En la Figura 3.18 se presentan los espectros FTIR-ATR para los derivados de queratina liofilizada obtenida mediante hidrólisis alcalina sometida a diferentes condiciones de procesamiento: **a)** NaOH (5 % m/v) a $60 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 h; **b)** NaOH (5 % m/v) a $40 \text{ }^\circ\text{C}$, 3 h; **c)** NaOH (5 % m/v) a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 6 h y **d)** NaOH (5 % m/v) a $20 \text{ }^\circ\text{C}$, 24 h.

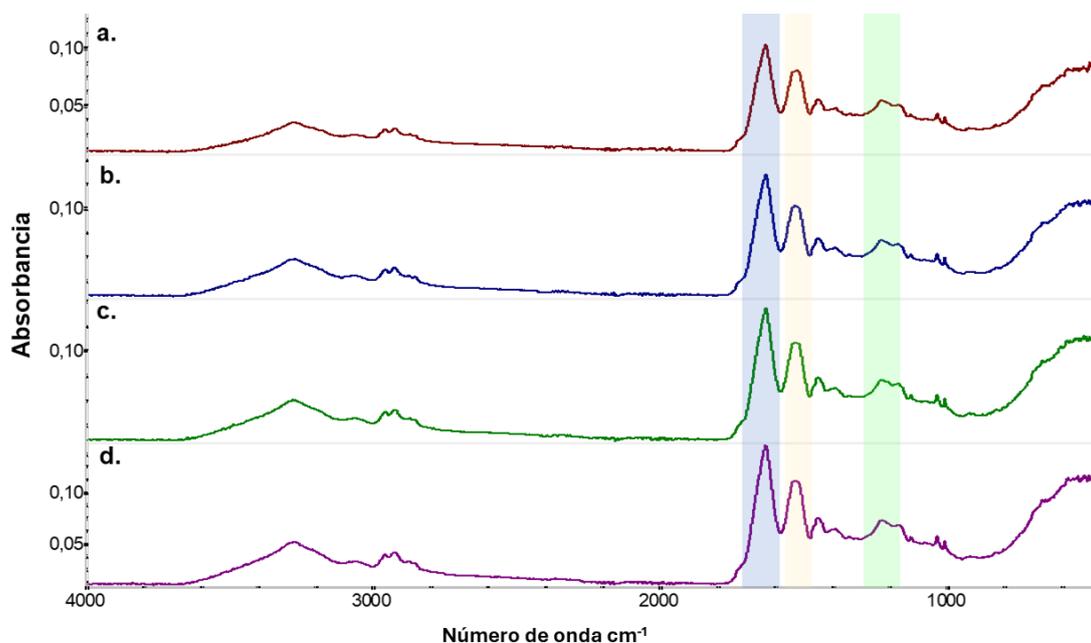


Figura 3.18. Espectros FTIR de queratina liofilizada obtenida mediante hidrólisis alcalina: **a)** NaOH (5 %m/v) a $60 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 h; **b)** NaOH (5 %m/v) a $40 \text{ }^\circ\text{C}$, 3 h; **c)** NaOH (5 %m/v) a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 6 h, **d)** NaOH (5 %m/v) a $20 \text{ }^\circ\text{C}$, 24 h. Rango de 4000 a 400 cm^{-1} .

Se observa la presencia de la banda Amida A en la longitud de onda 3275 cm^{-1} , la Amida B a 3073 cm^{-1} , así como las señales correspondientes al estiramiento del grupo $-\text{CH}$ ($2960 - 2920 \text{ cm}^{-1}$). La Amida I se observó a 1638 cm^{-1} , la Amida II se presentó a 1533 - 1535 cm^{-1} y la Amida III se presentó a 1236 cm^{-1} .

**Capítulo III. Metodologías de solubilización de plumas de pollo
para la obtención de queratina**

En los espectros (a- d) se evidencia la presencia de las bandas representativas correspondientes a la queratina presente en las plumas de pollo, confirmando que para las condiciones de proceso evaluadas se obtienen derivados de queratina que conservan la estructura de la proteína.

En la figura 3.19 se presentan los espectros FTIR-ATR de los productos obtenidos mediante la metodología de reducción con sulfuro de sodio, se confirma la presencia de bandas en la región 1700 a 400 cm^{-1} correspondientes a los enlaces peptídicos identificados como las Amidas I (1600 a 1690 cm^{-1} ; combinación de las estructuras α -hélice y hoja β -plana y está relacionada con las vibraciones de $\nu(\text{C}=\text{O})$), Amida II (1580-1480 cm^{-1} ; relacionada con la flexión del $\delta(\text{N-H})$ y el estiramiento del enlace $\nu(\text{C-H})$) y Amida III (1300 y 1220 cm^{-1} ; se deriva del estiramiento simétrico $\nu(\text{C-N})$ y la flexión de $\delta(\text{CH})$). Estas bandas proporcionan información importante sobre la conformación de la estructura de la queratina presente en las plumas de pollo e indican que para los procesos estudiados se conserva la estructura de la queratina sin degradarla por completo.

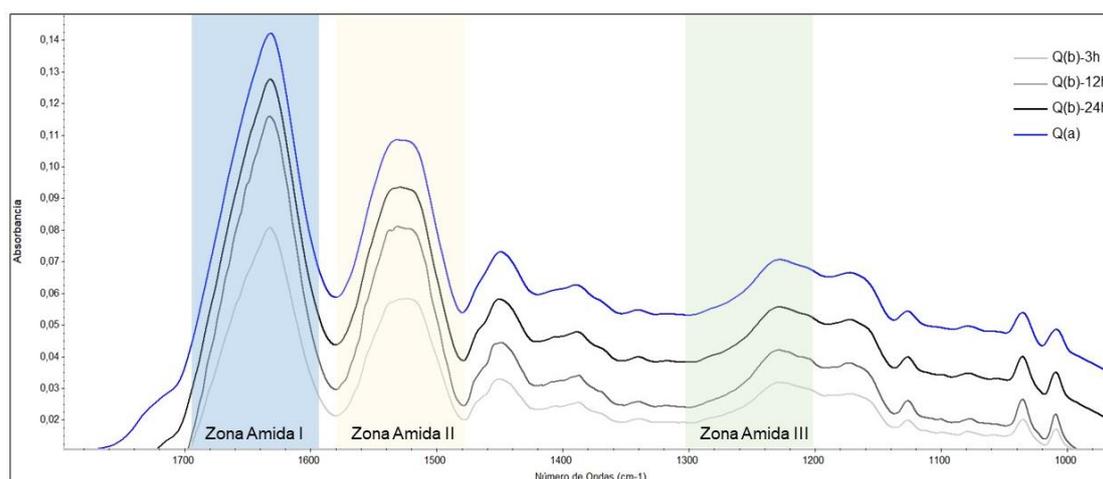


Figura 3.19. Espectros FTIR-ATR de queratina liofilizada obtenida mediante reducción en medio alcalino con sulfuro de sodio (Na_2S).

Rango de 2000 a 900 cm^{-1}

3.6.2.2 Determinación del peso molecular

El análisis de los pesos moleculares (PM) de los hidrolizados se realizó mediante la electroforesis en gel de Tricina/SDS-PAGE. Las muestras se incubaron a 100°C por 3 min en condiciones reductoras (DTT 1%*m/v*). Se identificaron dos fracciones de 66 y 14,4 kDa en todas las muestras. En Q(a) predominó la fracción 14,4 kDa (monómero) sobre la fracción 66 kDa; mientras que en Q(b) la fracción monomérica fue menos notoria, con algún daño en la cadena. La ausencia de fracciones por debajo de 14,4 kDa sugiere que la cadena primaria de la queratina se mantuvo intacta a tiempos cortos de procesamiento según Q(a) y Q(b).

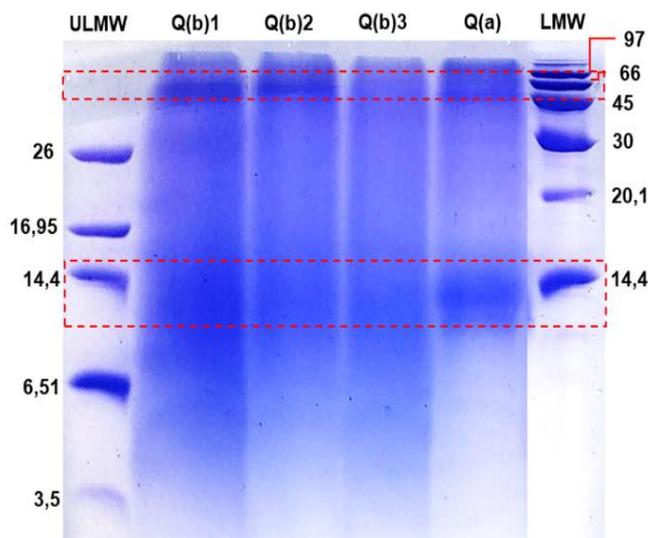


Figura 3.20. Gel Tricina/SDS-PAGE de la queratina obtenida por reducción con Na_2S . Los carriles de los extremos corresponden a los marcadores de peso molecular empleados (LMW y ULMW).

Cardammone y col. (2010), reportaron para queratina extraída por hidrólisis de lana con NaOH una clara banda a 6,5-14,4 kDa debido a la generación de fragmentos peptídicos de bajo peso molecular, mientras que para la lana molida el rango de peso molecular fue de 40-60 kDa. Wang y col., (2017), reportaron rangos de peso molecular para queratina extraída a partir de plumas de pollo,

**Capítulo III. Metodologías de solubilización de plumas de pollo
para la obtención de queratina**

indicando que consiste principalmente en fracciones de bajo a muy bajo peso molecular (11, 20 y 28 kDa), además de una pequeña fracción a 55 kDa.

Poole y col., (2011), analizaron los cambios en los rangos de peso molecular cuando se aplicó Na₂S (pH= 14) y entre 0,5 y 6 h para solubilizar las plumas de pollo. Indicaron que la queratina disuelta presentó 7 bandas entre 90-10 kDa, siendo la banda de 10 kDa la más notoria y correspondiendo entre un 68-70 % del material presente. Kamarudin y col. (2017), reportaron tras tres etapas de purificación de queratina proveniente de plumas de pollo, rangos entre 3 y 14 kDa y una banda a 62 kDa. De acuerdo a Floris y Slangen (2005), la queratina tiene peso molecular entre 1 y 11 kDa.

3.7 Conclusiones del capítulo II

- Se evaluaron diferentes metodologías de solubilización aplicadas al tratamiento de la biomasa de plumas. Se incluyó como metodología control la reducción con 2-mercaptoetanol, método ampliamente aplicado a nivel industrial por sus altos rendimientos de extracción de queratina, pero muy tóxico y con un elevado grado de contaminación.
- Se determinaron las condiciones de proceso para las metodologías de solubilización por reducción e hidrólisis de plumas de pollo, indicando un mejor rendimiento de solubilización y mayor contenido de proteína soluble cuando se aplica la temperatura más alta (60 °C) y el tiempo más corto (1 h). Las metodologías Red 1 y H1 lograron altos porcentajes de rendimiento de solubilización (%Pluma_{sol} > 83 %) y de proteína soluble extraída. Basado en los resultados, las metodologías **H1** y **Red 1** podrían ser empleadas como una opción viable más económica y segura en el reemplazo de la metodología convencional con el uso de 2-MEC.

**Capítulo III. Metodologías de solubilización de plumas de pollo
para la obtención de queratina**

- Tras la etapa de solubilización de las plumas de pollo con la metodología Red 1 y H1, se encontró que rompen cerca de un 50 % los enlaces disulfuro presentes en la queratina. La modificación química con el agregado de ácido monocloroacético (MCA) permitió la modificación de los grupos -SH libres, siendo significativamente mayor para la relación de MCA al 0,5 %m/v respecto del MCA al 0,2 %.
- Se estudió el comportamiento térmico mediante Calorimetría diferencial de barrido (DSC) para las fracciones que constituyen las plumas de pollo, encontrando una variación en la temperatura y entalpía de desnaturalización, debido a diferencias en el ordenamiento molecular y empaquetamiento de la estructura de la queratina que se presentan según la biomasa de partida y la fracción. En el caso de los derivados de queratina con y sin modificación, se logró identificar que tienen alta resistencia térmica con transiciones térmicas entre 150 y 250 °C.
- El análisis de la estructura por FTIR confirmó la presencia de los picos característicos (Amida A, I, II, III) asociados a la fracción de α -hélice y hoja β -plana de la molécula de queratina en los diferentes productos en polvo obtenidos mediante reducciones o hidrólisis, con y sin etapa de modificación, así como la presencia de los principales grupos funcionales (C-S y S-H).
- Con el propósito de diseñar una metodología que pueda ser industrialmente escalable y que permita producir queratina a bajo costo, se modificaron las extracciones por reducción con Na_2S e hidrólisis con NaOH ; se evaluaron diferentes condiciones del proceso y se reemplazó la etapa de diálisis por fases de lavado/precipitados consecutivos. Se identificó que el rendimiento del proceso depende de las condiciones operativas tales como la

**Capítulo III. Metodologías de solubilización de plumas de pollo
para la obtención de queratina**

concentración de los reactivos, la temperatura y el tiempo de reacción. Los porcentajes más altos de rendimiento se lograron cuando se aplicaron altas concentraciones del reactivo en conjunto con las mayores temperaturas y menores tiempos de reacción. Para el caso de hidrólisis con NaOH las condiciones óptimas resultaron 4-5 %, 60 °C y 1 h y para la reducción con sulfuro de sodio Na₂S 0,1M, 60 °C y 1 h, obteniendo en ambos casos dispersiones con altos contenidos de queratina soluble.

- Para estos derivados se comprobó mediante el análisis FTIR-ATR que se extrajo la queratina presente en la biomasa de partida, evidenciado por la presencia de las bandas características de la proteína en su forma nativa (pluma) como la Amida A, I, II, III asociados a la fracción de α -hélice y hoja β -plana, indicando que en las condiciones aplicadas se logró extraer queratina sin degradarla totalmente.
- Adicionalmente, se analizaron los rangos de peso molecular para los derivados solubles de queratina mediante geles Tricina/SDS-PAGE, técnica que se usa para separar proteínas en el rango 1–100 kDa; se identificaron dos fracciones de 66 y 14,4 kDa en todas las muestras. La ausencia de fracciones por debajo de 14,4 kDa sugiere que la cadena primaria de la queratina se mantuvo intacta.
- Estas metodologías modificadas sin diálisis son una alternativa viable para la obtención de queratina a nivel industrial y la revalorización de la biomasa generada por la industria avícola.

BIOMATERIALES POROSOS DE QUERATINA A PARTIR DE LA BIOMASA DE PLUMAS DE POLLO

CAPITULO IV



4.1 Introducción

La biomasa de plumas de pollo generada por la industria avícola es una fuente abundante y disponible para la obtención del biopolímero proteico queratina; por su composición presenta un gran potencial para la fabricación de distintos biomateriales en formato de esponjas, recubrimientos, microfibras, geles, con aplicaciones en el campo médico, agrícola, ambiental, etc.

Las esponjas son estructuras porosas que poseen ciertas propiedades mecánicas, morfológicas y de biodegradabilidad; pueden soportar la formación 3D de tejidos, favorecen la migración, adhesión y proliferación celular, permitiendo la difusión de nutrientes y metabolitos en las células (Sánchez Ramírez y col., 2018). Los biopolímeros proteicos tienen un rol central en la producción de esponjas; el colágeno, la elastina, la fibronectina y la laminina han sido ampliamente usados en la generación de esponjas (Malafaya y col., 2007; Madaghiele y col., 2014). La queratina ha ganado gran interés en la fabricación de esponjas debido principalmente a su biocompatibilidad, biodegradabilidad, resistencia mecánica y abundancia en la naturaleza (Rouse y Van Dyke, 2010). Se puede ordenar en forma de hidrogel, red 3D similar a la esponja, formada por cadenas poliméricas en presencia de poros interconectados; estos hidrogeles se pueden obtener mediante métodos de solubilización por reducción u oxidación (Cardamone y col., 2013).

Para la formación de las esponjas de queratina el método de secado más apropiado es la liofilización, debido a la capacidad de auto-ensamblaje 3D de la queratina (Vasconcelos & Cavaco-Paulo, 2013).

4.1.1 Aplicaciones de los materiales porosos de queratina

En la evolución del desarrollo de biomateriales a partir de queratina se han obtenido diferentes tipos de esponjas partiendo de diversas biomasas como el cabello humano, lana, plumas, entre otras; aplicadas principalmente en los campos de la biomedicina e ingeniería de tejidos. En el caso de las esponjas obtenidas a partir de cabello y lana han demostrado buena compatibilidad para aplicaciones en ingeniería de tejidos (Tachibana y col., 2002; Aboushwareb y col., 2009; Hill & Van Dyke., 2010). Balaji y col., (2012) obtuvieron esponjas porosas a partir de queratina de lana para su utilización como andamio celular en ingeniería de tejidos. Wan y col., (2017) estudiaron las aplicaciones médicas de las esponjas de la queratina, principalmente en la medicina regenerativa de tejidos en la cicatrización de heridas; demostraron que las esponjas de queratina permiten el intercambio gaseoso, previenen que los microorganismos infecten la herida, no son tóxicas, ni producen alergias, son biocompatibles, biodegradables y fáciles de remover; además su estructura altamente porosa permite la absorción del fluido tisular y los exudados de la herida in vivo. Tachibana y col., (2012), obtuvieron esponjas de queratina mediante liofilización, para uso en cultivo celular.

4.1.2 Biomateriales de queratina como materiales sorbentes para el tratamiento de contaminantes de efluentes industriales: caso aceites y derivados de hidrocarburos

Las diferentes actividades industriales generan entre sus residuos efluentes de carácter oleoso incluyendo aceites, grasas, crudo y sus fracciones derivadas; los derrames de estas sustancias en suelo y/o fuentes hídricas causan importante contaminación ambiental, afectando gravemente los ecosistemas y a las

Capítulo IV. Biomateriales porosos de queratina a partir de la biomasa de plumas de pollo

comunidades. La producción mundial de crudo para el período comprendido entre 2019-25 comprende un crecimiento aproximado de 5,7 miles de barriles (mb)/día (IEA, 2020). En Argentina, se espera que se mantenga la tendencia de la evolución histórica de la producción nacional de crudo convencional hasta el año 2030 y se alcance una producción de crudo de 660,3 mb/día (Escenarios estratégicos 2030, Ministerio de Energía y Minería MINEM, 2022). En 2020 se alcanzó la producción de 571 mb/día, el número más alto de los últimos once años, un 14 % más que el mismo mes del año 2019 y un 10% más que el promedio del año 2019 en la pre-pandemia (MINEM, 2022). Los derrames de hidrocarburos y aceites pueden ser accidentales o por negligencia humana; las causas que los provocan son, por ejemplo, la poca revisión mecánica en equipamientos, accidentes durante el transporte, malas condiciones de almacenamiento, generando grandes volúmenes de efluentes contaminados. El crudo y sus derivados no son fáciles de remover y permanecen en el ecosistema afectado a menos que sean removidos por un método apropiado. Existen métodos físicos/químicos para la remoción; debido a la contaminación, los altos costos, baja capacidad de sorción, los métodos físicos y químicos de separación de crudo y aceites no son aplicados (Kelle, & Eboatu, 2018), creciendo así el interés por métodos alternativos, que utilizan materiales biodegradables, económicos que permitan remover el contaminante de la superficie. Por otro lado, Argentina se mantiene como uno de los mayores productores de diferentes aceites vegetales (girasol, palma, soja, colza, etc.); en el 2021 se consolidó como un año provechoso para la producción y las exportaciones de la mayoría de los aceites vegetales, con buenos precios internacionales (Bolsa de Comercio de Rosario, 2018). La industria de aceites vegetales genera efluentes provenientes

Capítulo IV. Biomateriales porosos de queratina a partir de la biomasa de plumas de pollo

de distintas etapas como las aguas del lavado y/o las aguas de centrifugación o decantación del aceite luego de su prensado y extracción. El efluente líquido de la industria aceitera presenta como principales contaminantes aceites, grasas y sólidos suspendidos. Los valores medios de DBO₅ de los efluentes de la industria aceitera fluctúan entre 2000 y 30000 mg/L (Ahmad y col., 2005); es un desafío tratar este tipo de derrames en fuentes hídricas ya que se genera una capa en la superficie que limita la penetración de oxígeno en el agua, alterando los ecosistemas acuáticos (Wahi y col., 2013). Los materiales sorbentes son sustancias que tienen la capacidad de remover componentes tóxicos contaminantes mediante los fenómenos de adsorción y/o absorción, proceso amigable con el ambiente, económico y altamente eficiente en la remoción de diferentes tipos de contaminantes (Karan y col., 2011).

El uso de biopolímeros es una metodología que ha ganado popularidad en las últimas décadas; diferentes tipos de biomateriales se utilizan ampliamente incluyendo paja de arroz, algodón, carbón activado, etc.; estos están disponibles en abundancia, son rentables, biodegradables y no tóxicos y pueden considerarse ideales como absorbentes de aceite en el tratamiento de derrames de petróleo (Wolok y col., 2020). En el caso de petróleo, los biomateriales que actúan como sorbentes se utilizan principalmente para escenarios de derrames a pequeña escala; pueden remover o recuperar el contaminante ya sea por adsorción como un recubrimiento externo del crudo sobre la superficie material, o mediante la absorción donde el crudo es incorporado internamente en los poros; o por combinación de ambos mecanismos (Karan y col., 2011). Los biomateriales obtenidos a base de queratina tienen capacidad de sorción de diferentes contaminantes incluido el crudo y aceites mediante la combinación de

Capítulo IV. Biomateriales porosos de queratina a partir de la biomasa de plumas de pollo

mecanismos de sorción físicos donde el crudo se ubica en los poros y/o en la superficie del material y químicos donde se presenta una interacción con los grupos funcionales de la queratina (Ifelebuegu y col., 2017).

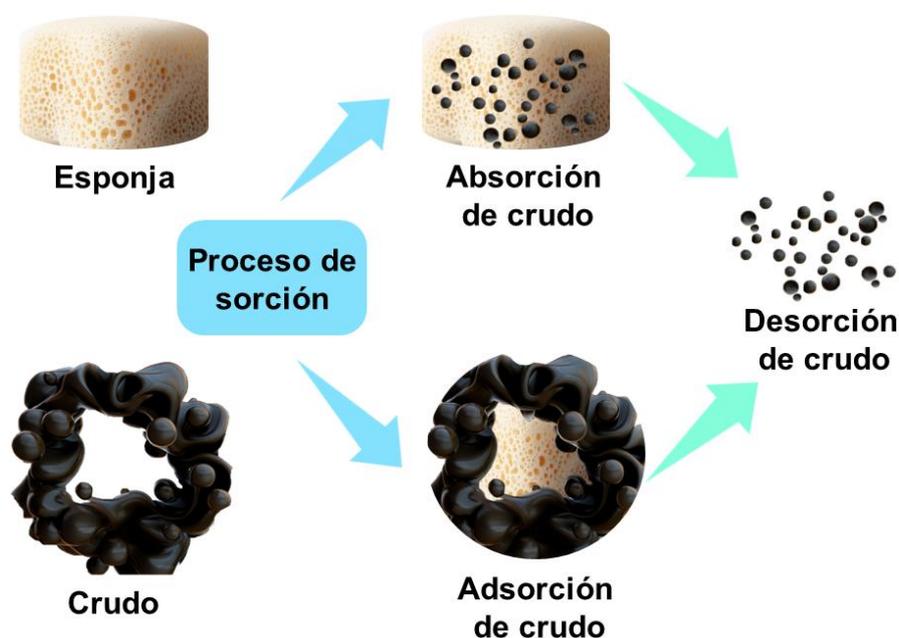


Figura 4.1. Esquema representativo de los mecanismos físicos y químicos de adsorción/absorción de crudo por las esponjas de queratina.

La capacidad de sorción de crudo o petróleo en biopolímeros puede verse afectada por diferentes factores, como la densidad, porosidad y morfología de la superficie del material, así como la presencia de grupos funcionales y aminoácidos que afectan a las propiedades de sorción (Ifelebuegu & Momoh, 2015; Ifelebuegu & Johnson, 2017). Existen algunos antecedentes del uso de queratina para la formación de esponjas. Tonin y col. (2010) realizaron la solubilización de lana para obtener esponja de queratina utilizando metabisulfito de sodio como agente reductor, urea como agente desnaturalizante e hidróxido de sodio para regular el valor de pH a 6,5. Zhou y col. (2014) utilizaron esponjas de queratina altamente porosas como posible sorbente para la gestión de vertidos de petróleo.

Capítulo IV. Biomateriales porosos de queratina a partir de la biomasa de plumas de pollo

El diseño e implementación de metodologías limpias que permitan desarrollar biomateriales porosos aprovechando una biomasa abundante y disponible como lo son los residuos de la industria avícola, es una propuesta de valor para contribuir a la mitigación de la contaminación ambiental y valorizar la cadena productiva.

4.2 Objetivos específicos del capítulo IV

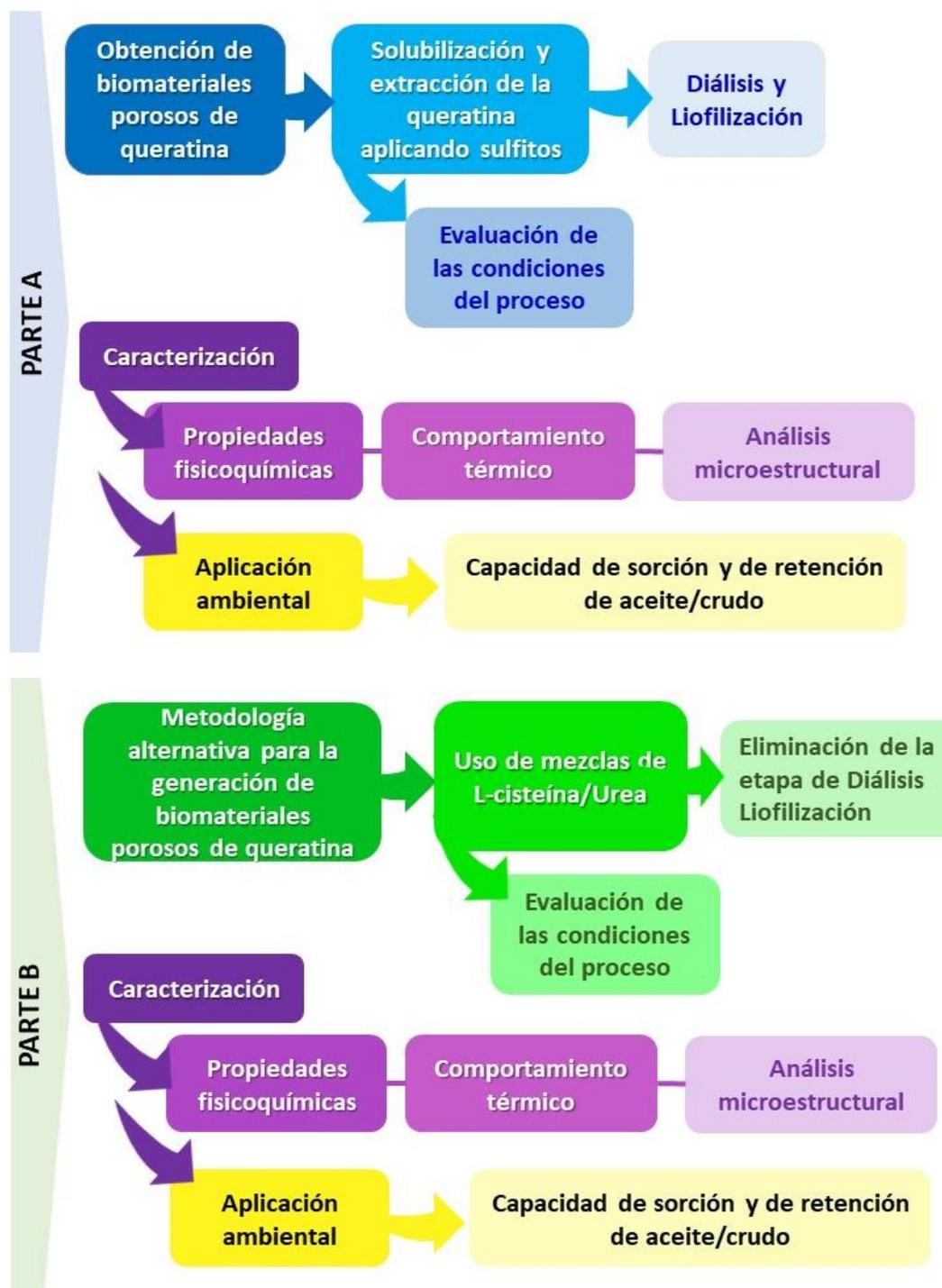
- I. Desarrollar biomateriales porosos con características sorbentes mediante el auto-ensamblado de la queratina, aplicando diferentes metodologías de solubilización con sulfitos en condiciones alcalinas o ligeramente ácidas, evaluando las variables del proceso tales como tiempo y temperatura.
- II. Analizar las propiedades fisicoquímicas de las matrices porosas obtenidas a través de técnicas de Calorimetría diferencial de barrido (DSC) y Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR).
- III. Estudiar las propiedades de sorción de agua mediante la isoterma de sorción y el modelado matemático.
- IV. Evaluar la aplicabilidad de las matrices obtenidas como materiales con capacidad de sorción y retención de aceite y crudo para ser usados en la limpieza de derrames de hidrocarburos.
- V. Rediseñar las metodologías de extracción de queratina, proponiendo el uso de nuevos agentes desnaturalizantes, optimizando el proceso mediante la sustitución de la etapa de diálisis.
- VI. Caracterizar fisicoquímicamente los biomateriales a través de diferentes técnicas como Calorimetría diferencial de barrido (DSC) y Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR), SEM, análisis textural.

Capítulo IV. Biomateriales porosos de queratina a partir de la biomasa de plumas de pollo

- VII. Evaluar la aplicación ambiental en el control de derrames de crudo superficial y en medios acuosos de los biomateriales obtenidos, modelar las cinéticas de sorción y estudiar los ciclos de sorción/retención.

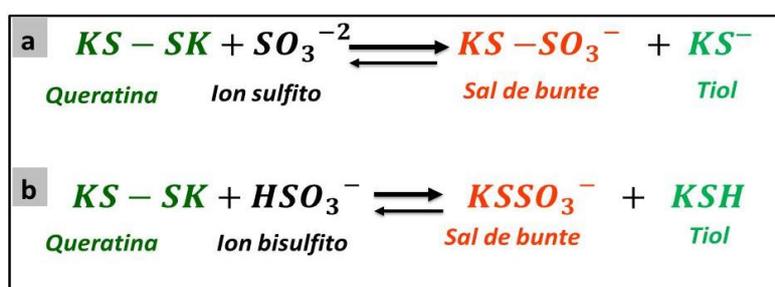
Los objetivos propuestos se alcanzaron mediante el siguiente esquema de trabajo:

Esquema del capítulo IV



4.3. Parte A. Aplicación de metodologías de sulfitolisis y reducción para la formación de biomateriales de queratina

La sulfitolisis es uno de los métodos de solubilización empleados para la generación de esponjas de queratina a partir de biomasas como las plumas de pollo, lana, pelo humano, etc.; consiste en emplear iones sulfito (SO_3^{-2}), bisulfito (HSO_3^-) y disulfito o piro-sulfito ($\text{S}_2\text{O}_5^{-2}$) con capacidad reductora de los enlaces disulfuro de la cistina presente en la queratina formando un grupo tiol y tiosulfato ($-\text{S}-\text{SO}_3$) también denominado sal de Bunte (Shavandi y col., 2017; Vineis y col., 2019) (Reacción 4.1 y figura 4.2).



Reacción 4.1: Sulfitolisis de la queratina con agentes reductores: (a) sulfito de sodio (Na_2SO_3) y (b) bisulfito de sodio (NaHSO_3)

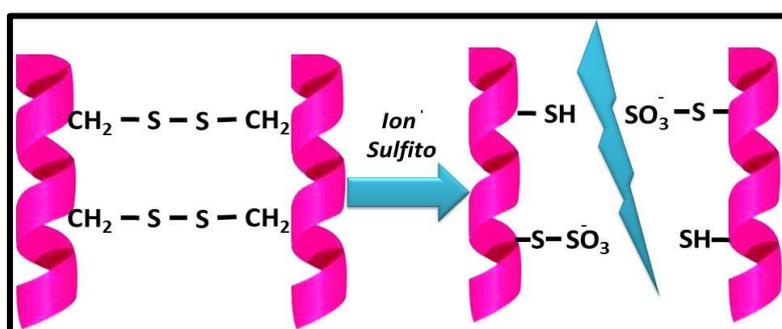


Figura 4.2 Escisión de enlace disulfuro de la cistina por sulfitolisis con ion sulfito. (Adaptado de Shavandi y col., (2017)).

A valores de pH superiores a 9, el proceso de sulfitolisis de la cistina es incompleto y reversible, dado que la velocidad de reacción es menor, por la repulsión entre los aniones carboxílicos de la proteína y los iones sulfito (Vineis

Capítulo IV. Biomateriales porosos de queratina a partir de la biomasa de plumas de pollo

y col., 2019). Esto puede ser mejorado con la adición de otros agentes desnaturalizantes como la urea y el SDS que pueden romper todos los enlaces disulfuro incrementando el rendimiento de extracción (Shavadi y col., 2017; Vineis y col., 2019).

Tonin y col., (2010) realizaron la solubilización de lana para obtener queratina aplicando metabisulfito de sodio como agente reductor, urea como agente desnaturalizante, e hidróxido de sodio para regular el valor de pH a 6,5; Sinkiewicz y col., (2016) reportaron buenos porcentajes de extracción de queratina a partir de plumas de pollo mediante el método de sulfitólisis; los autores mostraron que la sulfitólisis con metabisulfito y bisulfito sodio en concentraciones de 0,5M, incrementaron el rendimiento de extracción entre un 63 % y 82 %.

Con el fin de obtener esponjas a partir del auto-ensamblado de queratina de plumas de pollo, se aplicaron dos metodologías:

4.3.1. Bio-esponja de queratina E1

Esta metodología emplea para la extracción de la queratina de las plumas de pollo, sulfito de sodio (Na_2SO_3) que actúa como agente reductor cortando los enlaces disulfuro y permitiendo la extracción de la proteína sin dañar la cadena polipeptídica; se obtiene S-sulfo-queratina por el proceso de sulfitólisis. Asimismo, se adicionó urea como agente desnaturalizante para escindir los puentes de hidrógeno y SDS que actúa como agente tensioactivo, convirtiendo los enlaces disulfuro en grupos sulfhidrilos (-SH) y S-sulfo (sal de Bunte; Katoh y col., 2004). La adición del SDS proporciona estabilidad a la solución, evitando la reformación de los enlaces disulfuro y mejorando el rendimiento de extracción.

Capítulo IV. Biomateriales porosos de queratina a partir de la biomasa de plumas de pollo

Para esta metodología se aplicó el protocolo propuesto por Zhou y col., (2014) con modificaciones. Se prepararon 5 disoluciones a partir de 10 g de pluma previamente acondicionada (Capítulo II, sección 2.2.1) y 100 mL de una solución que contenía 0,125 M de sulfito de sodio (Na_2SO_3), 0,05 M SDS y 2 M de urea. Se usaron diferentes condiciones de extracción: **E1(a)** 15 minutos y 100°C; **E1(b)** 45 minutos y 80°C; **E1(c)** 60 minutos y 60°C; **E1(d)** 30 minutos y 80°C; **E1(e)** 30 minutos y 90°C.

Las soluciones resultantes fueron diluidas en una relación de 1:4 muestra/agua destilada; seguidamente, se filtraron con un lienzo con el fin de retirar los residuos de pluma sin disolver y luego se dializaron usando una membrana de celulosa de 16 mm de diámetro con retención de peso molecular mayor o igual a 12 kDa (D9777, Sigma-Aldrich Co, St. Louis MO, USA) durante un período de 72 h con cambios de agua destilada cada 24 h. Finalmente, las soluciones dializadas se almacenaron a -40 °C por 48 h y se liofilizaron en un equipo HETO Modelo FD 4 durante 48 h. Las esponjas se almacenaron protegidas de la humedad a -20 °C hasta el momento de su caracterización.

4.3.2 Bio-esponja de queratina E2

Esta metodología se basa en la extracción de queratina a partir de plumas de pollo en una etapa con sulfito de sodio (Na_2SO_3) mediante sulfitolisis a pH ligeramente ácido (pH= 6,5), rompiendo los enlaces disulfuro, obteniendo tioles y S-sulfonatos, formando las sales de Bunte, además de usar urea como agente desnaturizante que escinde los puentes de hidrógeno presentes en la proteína (Tonin y col., 2010). Se aplicó el protocolo propuesto por Tonin y col., (2010) con modificaciones; se pesaron 5 g de pluma previamente acondicionada y se

Capítulo IV. Biomateriales porosos de queratina a partir de la biomasa de plumas de pollo

adicionó un volumen de 100 mL de solución de urea 7,75M y sulfito de sodio 0,48M; se ajustó el pH a 6,5 mediante una solución de NaOH 20 % (m/v) agitando durante 2 h y a 65 °C. Luego se filtró la dispersión obtenida mediante un lienzo para retirar los residuos de pluma sin disolver. La dispersión de queratina obtenida se dializó mediante membrana de celulosa de 16 mm de diámetro con retención de peso molecular mayor o igual a 12 kDa (D9777, Sigma-Aldrich Co, St. Louis MO, USA) durante en 72 h con cambios de agua cada 24 h. La solución obtenida se congeló a -40 °C y se liofilizó por 48 h en un equipo HETO Modelo FD 4. Las esponjas de queratina se almacenaron a 4 °C hasta su caracterización.

4.4 Caracterización de las esponjas

4.4.1 Solubilidad en agua

Se determinó la solubilidad gravimétrica sobre fragmentos rectangulares de las esponjas E1 (a-e) y E2. Se pesó 0,1 g ($\pm 0,1$ mg) de cada muestra de esponja y se sumergió en 25 mL de agua destilada a pH=6, agitando por 24 h a 20 °C en un Agitador orbital Barnstead Lab-Line (Modelo SHKA4000-1CE). Los fragmentos remanentes de esponja se filtraron usando papel de filtro Whatman grado 1 (cualitativo) y la fase acuosa se reservó; los fragmentos de esponja se secaron en una estufa con circulación forzada de aire (Sanjor serie SL DB; Buenos Aires, Argentina) a 105 °C hasta alcanzar un valor de peso constante. El porcentaje de solubilidad (% p/p) de las esponjas de queratina se calculó por medio de la Ecuación 4.1:

$$\text{Sol}(\%) = [(m_i - m_f) / m_i] * 100 \quad (\text{Ec. 4.1})$$

Donde m_i es la masa seca inicial y m_f es la masa seca final de las muestras de esponja utilizadas.

Capítulo IV. Biomateriales porosos de queratina a partir de la biomasa de plumas de pollo

Para determinar si las matrices porosas que constituyen las esponjas de queratina obtenidas liberaban proteína en medio acuoso (pH= 6), se midió la concentración de proteína soluble presente en la fase acuosa obtenida en el filtrado mediante el método de Biuret (*Capítulo II; sección 2.2.4.*). Se tomó una alícuota de 0,5 mL de la fase acuosa filtrada y se adicionó 2 mL de reactivo de Biuret. Se agitó y se dejó reaccionar durante 30 minutos. La absorbancia se leyó en un espectrofotómetro UV mini-1240 UV-Vis (Shimadzu Scientific Instruments, Japón) a una longitud de onda $\lambda = 550$ nm. Las determinaciones se hicieron por duplicado.

4.4.2 Calorimetría Diferencial de Barrido

Se realizó el análisis del comportamiento térmico de las esponjas de queratina mediante un equipo de Calorimetría Diferencial de Barrido DSC Q-100 (TA Instruments; USA). Se pesaron entre 1-3 mg de las esponjas en cápsulas de aluminio y se sellaron herméticamente; como referencia se utilizó una cápsula vacía. Se usó el método modulado a $\pm 0,5$ °C cada 40 segundos. La velocidad de enfriamiento fue de 10 °C/min hasta alcanzar -20 °C con isoterma de 4 minutos; la velocidad de calentamiento fue de 10 °C/min hasta 280 °C. Todas las determinaciones se hicieron por duplicado.

4.4.3 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) con Reflectancia total atenuada (ATR)

Los espectros infrarrojos de transformada de Fourier (FTIR) de los derivados de queratina desarrollados en el presente capítulo se obtuvieron con un espectrómetro, equipo Nicolet IS10 (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford,

USA) con accesorio de ATR (diamante). Se trabajó en un rango de números de onda desde 4000 a 400 cm^{-1} . Para cada muestra se colectaron 60 barridos con una resolución de 4 cm^{-1} que fueron acumulados. Los datos obtenidos se procesaron utilizando el software OMNIC TM de Thermo ScientificTM.

4.4.3.1 Análisis de la Amida I

Las bandas de absorción Amida I presentes en el espectro infrarrojo son de gran importancia para la caracterización de las proteínas; pueden ser analizadas individualmente para identificar los componentes de absorción atribuidos a las estructuras secundarias como la α -hélice, hoja β -plana y microestructuras desordenadas presentes en la queratina (Cardamone y col., 2010). Para realizar el tipo de análisis se procedió a la deconvolución de la señal de Amida I; el método consiste en aplicar la transformación Gaussiana/Lorentziana para la descomposición de la curva original de Amida I en una serie de curvas gaussianas, las cuales se obtuvieron con el software OMNIC TM de Thermo ScientificTM. Dichas curvas proporcionan información del tipo de estructura secundaria encontrado en la muestra analizada y se puede calcular el porcentaje relativo de cada tipo de estructura (Byler y Susi, 1986; Cortez, 2020).

El procedimiento consistió en:

1. Obtener el espectro de infrarrojo en la región de la Amida I (1700-1600 cm^{-1}).
2. Aplicar la 2^{nda} derivada a la banda de la Amida I.
3. Usando como referencia los picos direccionados hacia abajo en la 2^{nda} derivada a la banda de la Amida I, seleccionar los centros de las curvas gaussianas (figura 4.3).

4. Para el análisis y ajuste de las curvas seleccionadas, aplicar la transformación Gaussiana/Lorentzian y corregir la intensidad de banda, ancho a la mitad de la banda (Full Width at the Half-Height; FWHH).
5. Seleccionar las curvas gaussianas con apoyo de bibliografía propia de la muestra analizada.

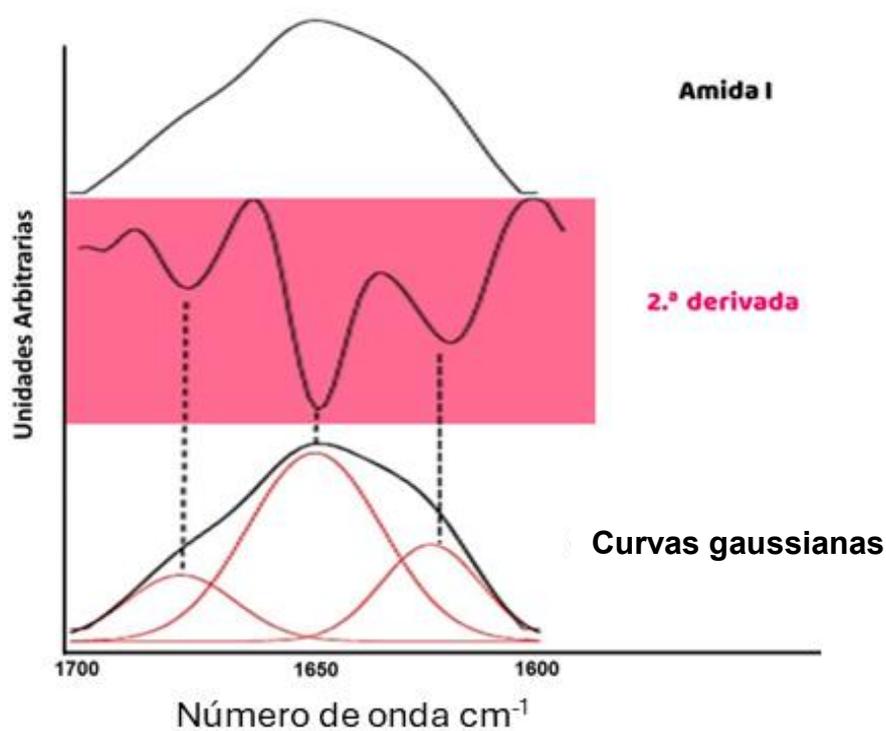


Figura 4.3 Esquema del procedimiento gráfico para las curvas gaussianas en la banda Amida I (Adaptado de Cortez, 2020).

A partir de las áreas de las curvas gaussianas obtenidas y seleccionadas se determinó el porcentaje correspondiente a cada tipo de estructura secundaria sumando las áreas bajo la curva de cada pico individual y expresando como fracción del área total. Algunas asignaciones se presentan en la tabla 4.2.

Tabla 4.2 Asignaciones de las estructuras secundarias correspondientes a distintos componentes que conforman la banda de Amida I de las proteínas.

Tipo de estructura	Número de onda (cm⁻¹)
Hoja β (intermolecular)	1690 - 1700
giro β	1660-1695
α - hélice	1650-1660
Desordenada	1640 - 1650
Hoja β (intramolecular)	1620 - 1640
Hoja β (intermolecular)	1610 - 1630

FUENTE: Basado en el trabajo *Torii H., Tasumi M. (1996)*

4.4.4 Propiedades de sorción de agua de las esponjas

Las isotermas de sorción de las esponjas obtenidas a partir de plumas con los tratamientos E1(e) y E2 fueron determinadas por el método estático gravimétrico a 20 °C (Rahman y Sablani, 2008). Las muestras de E1(e) y E2 de 1,5 g se almacenaron en recipientes herméticos que contenían soluciones saturadas de sales para proporcionar un rango de humedad relativa (HR) entre 11,3 y 97 %: Cloruro de litio (LiCl; 11,3 %), Acetato de potasio (CH₃COOK; 23,4 %), Cloruro de magnesio (MgCl₂; 33 %), Carbonato de potasio (K₂CO₃; 43,2 %), Nitrato de magnesio (Mg(NO₃)₂; 54,4 %), Cloruro de sodio (NaCl; 76 %), Cloruro de potasio (KCl; 82 %), Sulfato de potasio (K₂SO₄; 97 %).

Los pesos de las muestras se midieron cada tres días hasta alcanzar un valor constante (diferencia entre 3 pesadas consecutivas de $\leq \pm 0,0003$ g), donde se asume que se ha alcanzado el equilibrio; en este punto, la actividad acuosa (a_w) de la muestra equilibrada puede considerarse igual a su correspondiente HR/100 (Lomauro y col., 1985). Cada punto de la isoterma se hizo por duplicado. El

Capítulo IV. Biomateriales porosos de queratina a partir de la biomasa de plumas de pollo

contenido de humedad inicial de las esponjas de midió según el protocolo explicado en la sección 2.2.1 y la ecuación 2.1 (*Ver Capítulo II*).

Modelado matemático de las isotermas de sorción de agua y comparación estadística

La relación entre el contenido de humedad de equilibrio (W_c) y la actividad de agua (a_w) de los derivados de queratina se predijo mediante la ecuación Ec. 4.2 de 3 parámetros (Guggenheim-Anderson-de Boer, GAB), comúnmente usada en alimentos.

$$W_c = \frac{W_m \cdot K \cdot C \cdot a_w}{(1 - K a_w) \cdot [1 - K \cdot a_w + C \cdot K \cdot a_w]} \quad (\text{Ec. 4.2})$$

donde W_m es la humedad del material que corresponde a la situación en que los puntos de adsorción primarios están saturados por moléculas de agua. C es la constante de Guggenheim, característica del material y relacionada al calor de adsorción de la monocapa. K es el factor de corrección relacionado con el calor de sorción de la multicapa.

Los parámetros se estimaron mediante regresión no lineal de los datos experimentales con los programas Origin Pro-v 8.0 (OriginLab Corp., Northhampton, MA USA).

La selección del modelo más apropiado se basó en su bondad de ajuste, evaluada mediante el porcentaje de error medio relativo (%E) que expresa la diferencia entre los datos predichos y experimentales (Ec. 4.3):

$$\%E = \frac{100}{n} \sum_{i=1}^n \frac{|W_{c_i} - W_{c_{pi}}|}{W_{c_i}} \quad \text{Ec. 4.3}$$

Dónde “n” es el número de datos experimentales, W_{ci} y W_{cp} los valores de humedad experimentales y predichos respectivamente.

4.4.5 Aplicación ambiental

Se evaluó el desempeño de las esponjas de queratina como biomateriales sorbentes en el control de derrames de aceite y derivados de hidrocarburos.

4.4.5.1 Capacidad de sorción de aceite (CSA) y de crudo (CSC)

En este ensayo se determinó la capacidad de sorción de aceite y crudo de las esponjas de queratina mediante el protocolo propuesto por Zhou y col., (2014) con modificaciones. Para este ensayo, se eligió aceite de girasol refinado comercial (Cocinero, Molinos Río de la Plata, Argentina) y crudo ($\rho=0,885$ g/ mL) provisto por la refinería YPF de La Plata.

Se cortaron fragmentos rectangulares de las esponjas E1 (a-d) y E2 de 0,1 g, los fragmentos se sumergieron en 10 mL de aceite puro de girasol o crudo. Después de 5 minutos de sorción, se retiró y drenó por 30 segundos hasta que no quedaran gotas residuales de aceite sobre la superficie. La capacidad de sorción fue calculada a partir de la siguiente ecuación 4.4:

$$Cap. sorción \left(\frac{g}{g} \right) = \frac{(W_s - W_o)}{W_o} \quad (\text{Ec. 4.4})$$

donde, W_s es la masa del material sorbente después de la sorción (g) y W_o es la masa inicial de la esponja (g).

4.4.5.2 Capacidad de retención de aceite (%CRA) y de crudo %(CRC)

Una vez finalizada la etapa de captación, se prosiguió a determinar la capacidad de retención del material de la siguiente manera: Después de la sorción por 5

Capítulo IV. Biomateriales porosos de queratina a partir de la biomasa de plumas de pollo

minutos, la esponja mojada fue drenada 30 s y luego centrifugada a 500 rpm; se registró el peso final la esponja (W_f). La capacidad de retención se calculó mediante la ecuación 4.5:

$$\text{Cap. retención (g/g)} = \frac{W_f}{W_s} * 100 \quad (\text{Ec. 4.5})$$

donde **Ws** es la masa del sorbente después de la sorción de aceite/crudo y **Wf** la masa restante de la esponja después de la centrifugación. Se realizó el ensayo por duplicado.

4.5.6 Análisis estadístico

Se realizó el correspondiente análisis estadístico de varianza mediante ANOVAS con el software Infostat v. 2020 (Grupo InfoStat, FCA, Argentina). La prueba t se aplicó para determinar diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios de máximo 2 muestras y las diferencias se compararon mediante la prueba de Tukey para comparaciones de más de 2 casos (muestras) usando un nivel de significancia $\alpha = 0,05$ para ambas pruebas.

4.5. Resultados y discusión

Se obtuvieron esponjas de queratina mediante dos metodologías de extracción por sulfitólisis con sulfito de sodio, el cual cumple la función de reducir la queratina presente en las plumas escindiendo los enlaces disulfuro (-S-S-), lo cual permite la extracción sin dañar la cadena polipeptídica. La metodología aplicada E1 corresponde a una adaptación del protocolo de Zhou y col., (2014) (SDS, Na_2SO_3 y urea; $T = 90^\circ\text{C}$ y $t_{\text{extracción}} = 30$ min) y la metodología E2 es una adaptación del protocolo propuesto por Tonin y col., (2010) (Na_2SO_3 y urea, $T =$

65 °C y $t_{extracción}= 120$ min); ambas generaron esponjas de queratina tras el proceso de liofilización debido a su capacidad de autoensamblado (Figura 4.4).



Figura 4.4 Esponjas obtenidas mediante **A) Metodología E1e** ((SDS, Na_2SO_3 y urea, $T= 90$ °C y $t_{extracción}= 30$ min) y **B) Metodología E2** (Na_2SO_3 y urea $T= 65$ °C $t_{extracción}= 120$ min).

La aplicación de la metodología E1(e) (SDS, Na_2SO_3 y urea) con condiciones de proceso de $T= 90$ °C y $t_{extracción}= 30$ min presentó la mejor formación de esponjas en comparación con E (a-d), indicando que la modificación de las condiciones de proceso incidió significativamente en la formación de las esponjas.

Este comportamiento concuerda con los resultados reportados por Zhou y col., (2014), quienes reportaron que a valores inferiores de temperatura y tiempos prolongados se obtiene buen rendimiento de extracción, sin embargo, el re-entrecruzamiento necesario para la formación de las esponjas se ve disminuido significativamente. La formación de las esponjas obtenidas mediante las metodologías E1 (a-d) (Tabla 4.1) fue incipiente (figura 4.5), debido a una baja concentración de proteína en la dispersión de queratina previo al proceso de

Capítulo IV. Biomateriales porosos de queratina a partir de la biomasa de plumas de pollo

liofilización, desfavoreciendo la reformación de entrecruzamientos de las cadenas de la proteína.

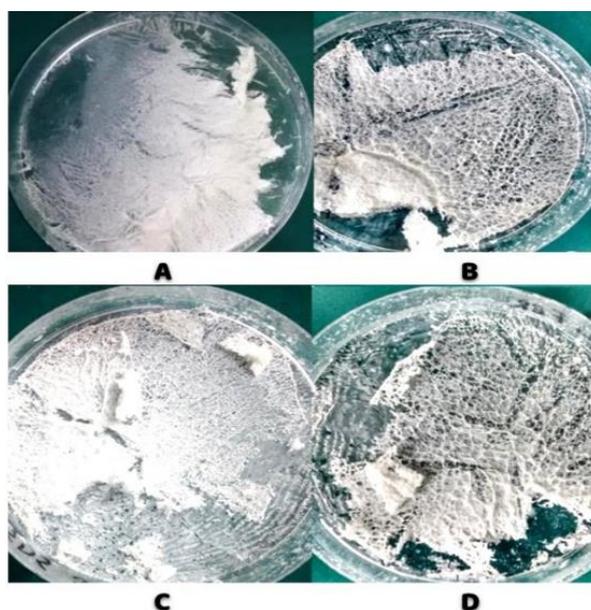


Figura 4.5 Esponjas obtenidas mediante la *Metodología E1* (SDS, Na₂SO₃ y urea): **A)** T= 100 °C y $t_{extracción}$ = 15 min; **B)** T= 80 °C y $t_{extracción}$ = 45 min; **C)** T= 60 °C y $t_{extracción}$ = 60 min; **D)** T= 80 °C y $t_{extracción}$ = 30 min.

4.5.1 Solubilidad de esponjas de queratina en agua

La solubilidad en agua de las esponjas obtenidas se evaluó mediante el método gravimétrico con el fin de evaluar la resistencia del material en medio acuoso manteniendo un valor de pH de 6; asimismo, se midió la proteína soluble en el medio para determinar si hay liberación de proteína por parte de las esponjas.

En la Tabla 4.3 se presentan los resultados obtenidos de los ensayos de solubilidad por el método gravimétrico para las esponjas de queratina.

Los fragmentos de las esponjas E1 y E2 no se disgregaron ni perdieron su forma cuando se sumergieron en agua destilada a pH= 6, indicando que los materiales obtenidos son hidrofóbicos; los porcentajes de solubilidad en agua de las esponjas de queratina fueron bajos y se encuentran entre un 4,8 y 5,8 % (Tabla

Capítulo IV. Biomateriales porosos de queratina a partir de la biomasa de plumas de pollo

4.3). Por otra parte, no se reportaron diferencias significativas en la proteína soluble, (<0,0125 g queratina/g de esponja), indicando que la queratina presente en las esponjas es prácticamente insoluble en agua.

Tabla 4.3. Porcentaje de solubilidad gravimétrica y la proteína liberada al medio acuoso a pH= 6 de las esponjas de queratina calculada por gravimetría.

Matriz	Variables de proceso		Solubilidad por gravimetría (%)	Proteína liberada al medio
	Tiempo (min)	Temperatura (°C)		
E1a	15	100	5,76±0,29 ^{bc}	0,0122±0,001 ^{ns}
E1b	45	80	5,61±0,09 ^{abc}	0,0120±0,001 ^{ns}
E1c	60	60	4,83±0,24 ^{ab}	0,0110±0,001 ^{ns}
E1d	30	80	5,34±0,37 ^{abc}	0,0120±0,001 ^{ns}
E1e	30	90	5,80±0,2 ^c	0,0125±0,001 ^{ns}
E2	120	65	4,81±0,05 ^a	0,0110±0,001 ^{ns}

*Los resultados son presentados como el promedio ± desviación estándar de las muestras por duplicado. Valores con diferentes superíndices (^{a,b,c}) presentan diferencias significativas mediante la prueba de Tuckey ($\alpha=0,05$). ns= no significativo.

4.5.2 Análisis del comportamiento térmico de las esponjas de queratina por calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se analizó el comportamiento térmico de las esponjas de queratina obtenidas por las metodologías E1e y E2, los termogramas de calentamiento obtenidos se presentan en las Figuras 4.6A y B.

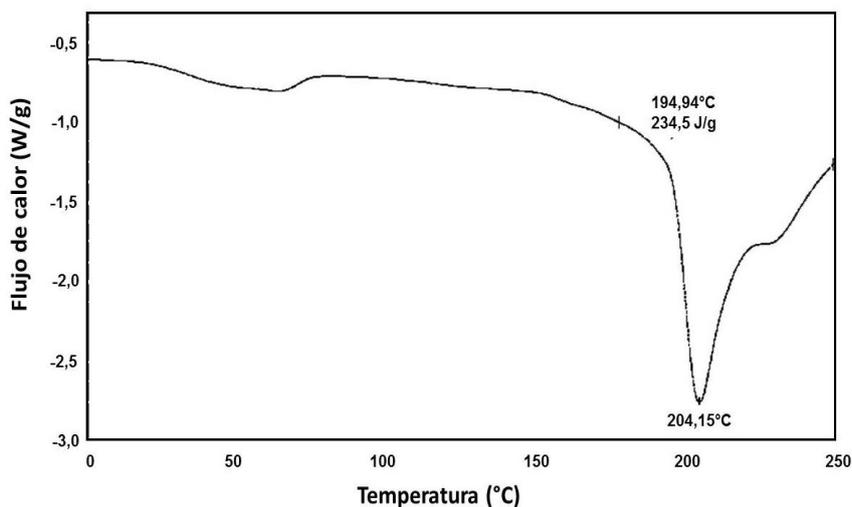


Figura 4.6.A Termograma de calentamiento de la esponja de queratina E1e (sulfitolisis oxidativa T= 90 °C y t= 30 minutos).

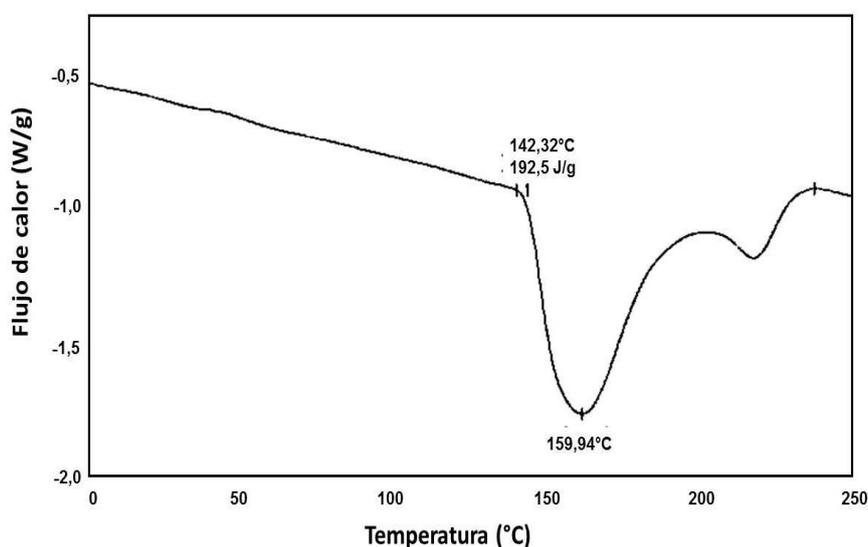


Figura 4.6.B Termograma de calentamiento de la esponja de queratina E2 (sulfitolisis T=65 °C y t= 120 minutos).

En el termograma de la esponja de queratina E1 se observa un pico endotérmico pronunciado a una temperatura de pico (T_p) de 204,2 °C con un valor de entalpía (ΔH) de 234,5 J/g; para la esponja de queratina E2 dicha transición se presenta a 160 °C y con un ΔH de 192,4 J/g. La transición endotérmica señalada en ambos casos corresponde a la degradación de la proteína, indicando que estos materiales presentan una alta estabilidad térmica. Las transiciones térmicas de

las esponjas están dentro de los rangos reportados para la desnaturalización de queratina en plumas de pollo secas (170 a 200 °C) por Takahashi y col., (2004). Patrucco y col. (2016) reportaron resultados similares a los obtenidos en el presente estudio, para esponjas de queratina obtenidas a partir de lana con una transición térmica entre 230 °C y 240 °C. En el termograma de E2 (Figura 4.6.B) se observa un pequeño pico endotérmico a mayor temperatura y podría ser atribuido a diferentes ΔH de transición de estructuras cristalinas de tipo α -helicoidal (Patrucco y col. 2016).

4.5.3 Espectroscopía infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR ATR)

Se analizaron los espectros FTIR con ATR para las esponjas de queratina obtenidas mediante las metodologías E1 y E2. Ambos tipos de esponjas presentan señales encontradas en las plumas de pollo y características de la queratina; dicho espectro presenta un gran número de bandas vibracionales, especialmente en la Amida I (1690 a 1600 cm^{-1}), Amida II (1575 a 1480 cm^{-1}) y la región de oxidación de la cisteína (1200 a 1040 cm^{-1}), la cual está solapada y proporciona información poco cualitativa (Barton, 2011). El espectro FTIR-ATR de la esponja de queratina E1 se presenta en la figura 4.7.A y B. En todos los espectros E1 a-e (Figura 4.7A y B) se observaron los picos 3300 cm^{-1} y 3417 cm^{-1} ; la Amida A se ha reportado a 3330 cm^{-1} y está asociada a la conformación α -hélice. Martínez-Hernández y col., (2005) reportaron la presencia de esta señal en fibras de queratina obtenidas a partir de lana asociadas con su conformación α -hélice; asimismo, coincide con la vibración de estiramiento del grupo -OH (Zhou y col., 2014). Además, se observaron la banda de Amida B (3056-3075 cm^{-1}) vinculado con vibración asimétrica $\nu(\text{NH})$ y un pico a 2930 cm^{-1} asociado

Capítulo IV. Biomateriales porosos de queratina a partir de la biomasa de plumas de pollo

a la vibración CH_3 de las cadenas de acilo en las queratinas (Martínez-Hernández y col., 2005). Se observan señales en la región 1700 a 1600 cm^{-1} , correspondientes a la Amida I y vinculados con las vibraciones del enlace $\text{C}=\text{O}$ de los grupos carbonilo para la conformación beta plana de la molécula de queratina (Wojciechowska y col., 2002; Martínez-Hernández y col., 2005).

Martínez-Hernández y col. (2005), reportó que el pico a 1666 cm^{-1} corresponde a esa vibración $\text{C}=\text{O}$ para la conformación beta. Por otra parte, Takahashi y col. (2004) reportó un pico en 1656 cm^{-1} asociado a la conformación helicoidal de la Amida I; en el espectro E1 se encontró un pico a 1615 cm^{-1} (Figura 4.7A) coincidente con lo reportado por Takahashi y col., (2004) para la Amida I.

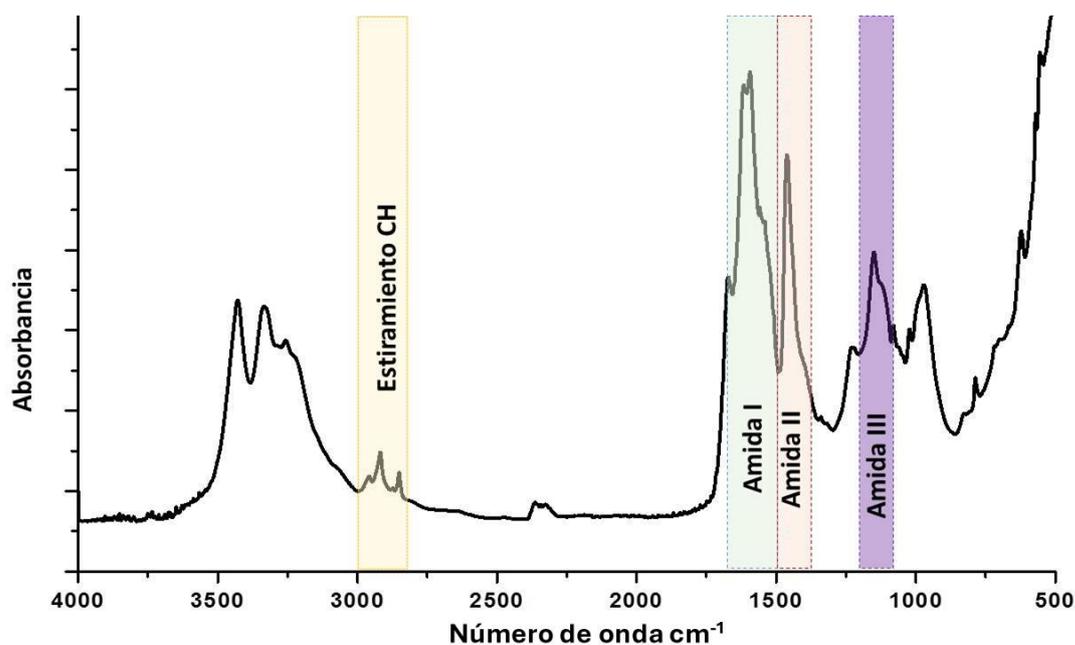


Figura 4.7.A. Espectro FTIR-ATR de la esponja de queratina E1e.

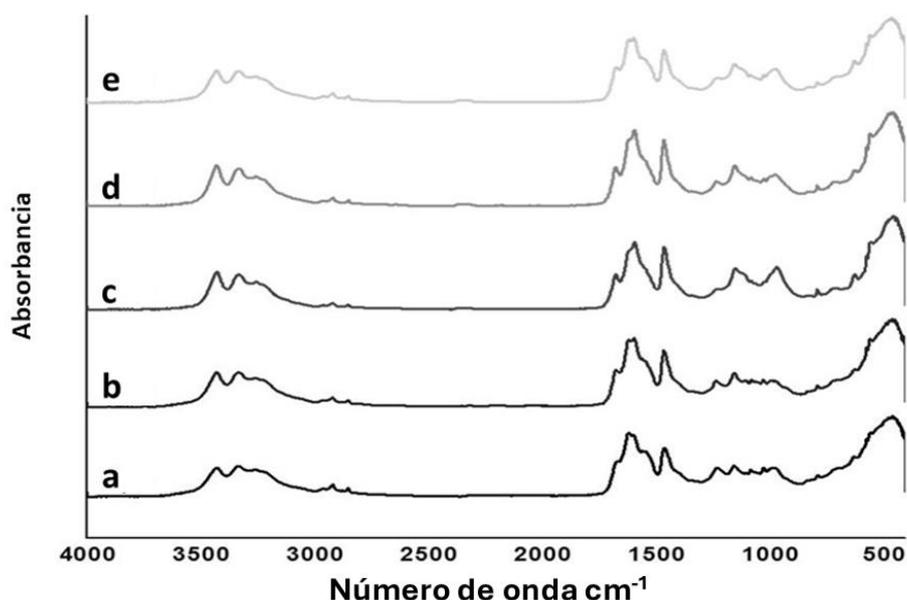


Figura 4.7.B Comparación de los espectros FTIR-ATR de las esponjas de queratina E1a-e.

Se observa un pico a 1470 cm^{-1} en el espectro E1e (Figura 4.7.A) vinculado con la Amida II. Zhou y col. (2014) reportaron en espectros de plumas de pollo y esponjas de queratina los picos 1450 cm^{-1} y 1540 cm^{-1} asociados a la vibración del grupo C-H que conecta con el átomo de N de la Amida, y la vibración N-H y C-N respectivamente. Wojciechowska y col., (2002) reportaron para fibras de queratina obtenidas a partir de lana señales a 1480 y 1580 cm^{-1} correspondientes a las vibraciones de los enlaces N-H y C-N de la Amida II. A su vez, los picos encontrados en la zona 1531 cm^{-1} pueden estar relacionados con la vibración N-H de una conformación beta para fibras de queratina obtenidas a partir de plumas de pollo (Martínez-Hernández y col., 2005).

Por otra parte, se observa la presencia de la Amida III (1230 y 1240 cm^{-1}) correspondientes a la conformación hoja beta plana (Martínez-Hernández y col., 2005). Los picos cercanos a la zona de 1174 cm^{-1} pueden vincularse con los enlaces C-C de aminoácidos de cadena lateral (Akhtar y col., 1997).

Capítulo IV. Biomateriales porosos de queratina a partir de la biomasa de plumas de pollo

En los espectros de las esponjas E1 el pico que se encuentra a 1020 cm^{-1} se asoció a la sal de Bunte (enlace S=O) formada a partir de queratina regenerada según lo estudiado por Zhou y col. (2014). Esta característica resulta común ya que la reacción de extracción implica un proceso de sulfitólisis donde los iones sulfito rompen los puentes disulfuro en tioles y aniones S-sulfonato. Sin embargo, al ser un proceso reversible mediante la extracción del sulfito, valores altos de sal de Bunte podrían indicar un remanente del reactivo a pesar de la etapa de diálisis. Por último, Martínez-Hernández y col., (2005) asociaron los números de onda 620 y 730 cm^{-1} al estiramiento C-S de alquitioles.

No se observaron diferencias significativas entre los espectros de las esponjas E1a-e (Figura 4.7.B) presentando todas las señales previamente mencionadas. Esto indica que las condiciones de proceso aplicadas no influyeron significativamente en la conformación estructural de las esponjas.

En el espectro FTIR de la muestra E2 (Figura 4.8), se observan todas las señales características de la queratina, así como la presencia de la sal de Bunte ($\nu\text{S=O}$). En comparación con las esponjas obtenidas mediante la metodología E1, no se observaron los picos 3300 cm^{-1} y 3417 cm^{-1} vistos en dichos espectros FTIR, observándose la única banda de la Amida A en la longitud de onda de 3271 cm^{-1} . Por otro lado, se observó un pico marcado en la región 1521 cm^{-1} , correspondiente a la flexión N-H para la conformación beta.

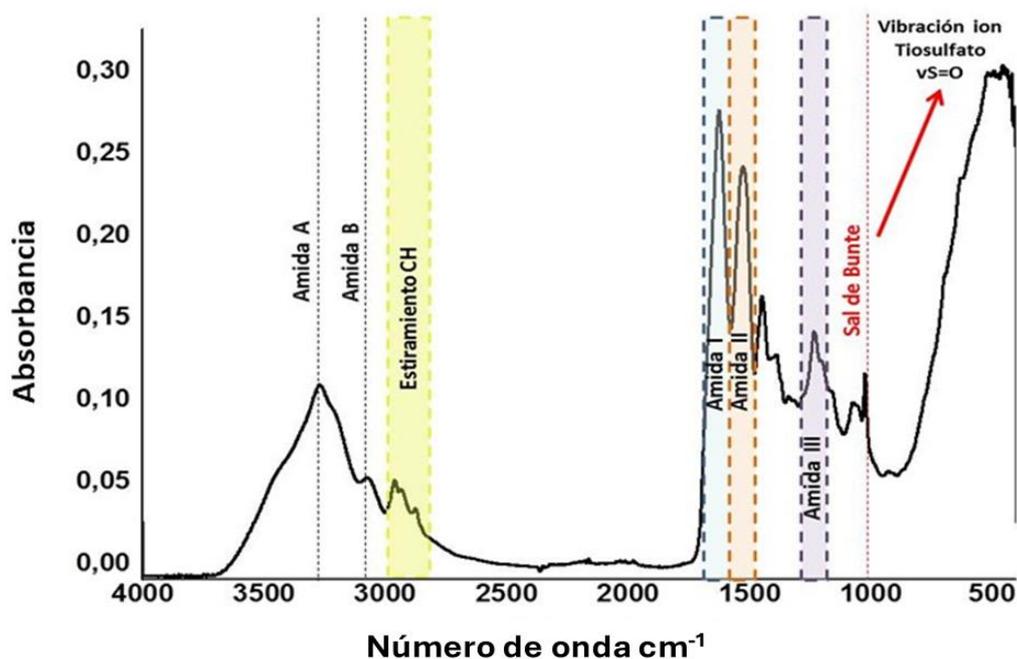


Figura 4.8. Espectro FTIR-ATR de la esponja de queratina E2.

Análisis de las Amida I

Se realizó el análisis de las Amida I mediante la deconvolución de la zona comprendida entre 1700 a 1550 cm^{-1} , con el fin de identificar y determinar la proporción de las estructuras secundarias α -hélice y hoja β -plana en las esponjas de queratina E1e y E2.

Se identificaron para ambas esponjas (E1e y E2) tres componentes correspondientes a las estructuras α -hélice (1657-1651 cm^{-1}); hoja β -plana (1631-1621 cm^{-1}) y microestructuras desordenadas (1697-1670 cm^{-1}).

Estos resultados concuerdan con los presentados por Cardamone y col., (2010), quienes informaron la 2.^a derivada de los espectros infrarrojos para hidrolizados de queratina de lana. Isarankura Na Ayutthaya y col., (2015) analizaron la banda Amida I para películas de queratina, encontrando curvas localizadas a 1650 cm^{-1} y 1610 a 1633 cm^{-1} correspondientes a las estructuras α -hélice y hoja β -plana, respectivamente.

En las figuras 4.9A y B se presentan los componentes deconvolucionados de la región Amida I, los cuales representan, alfa-hélice, hoja β -plana y estructuras desordenadas.

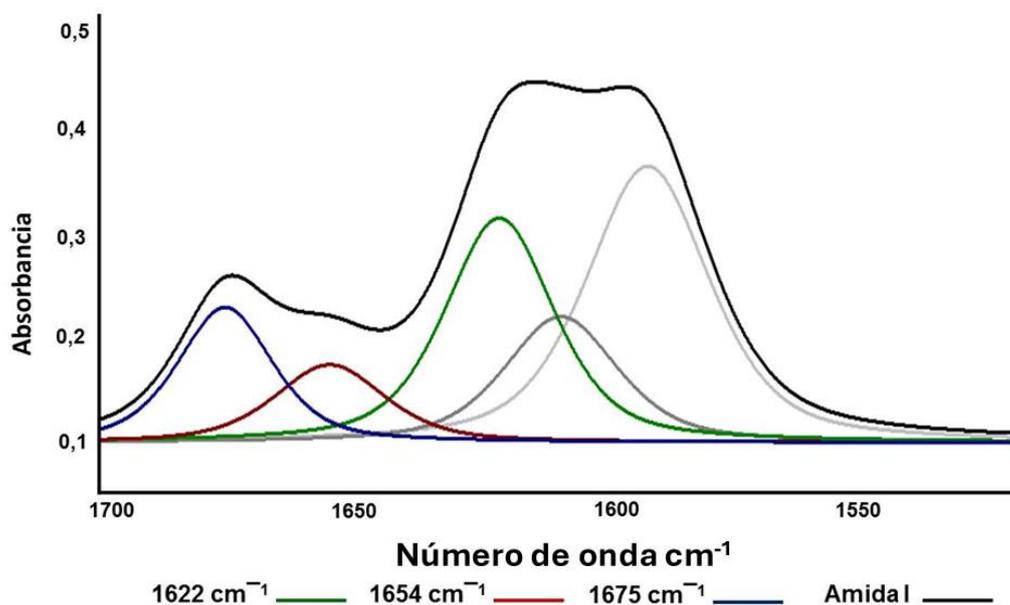


Figura 4.9.A. Banda Amida I y curvas gaussianas obtenidas mediante la deconvolución del espectro FTIR-ATR para la esponja E1e.

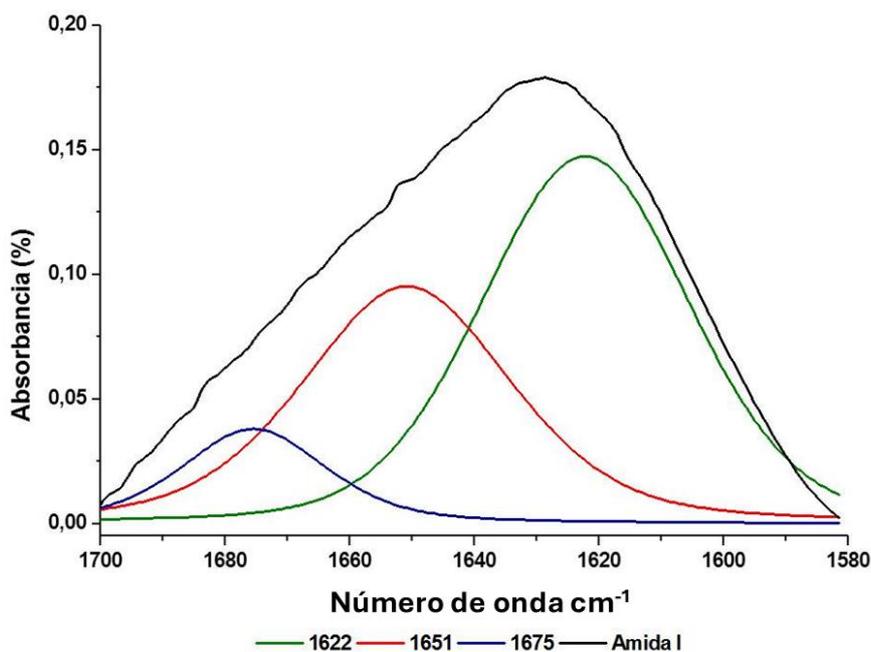


Figura 4.9.B. Banda Amida I y curvas gaussianas obtenidas mediante la deconvolución del espectro FTIR-ATR para la esponja E2.

Capítulo IV. Biomateriales porosos de queratina a partir de la biomasa de plumas de pollo

Se determinó el porcentaje relativo de las estructuras secundarias presentes en las esponjas E1e y E2, analizadas mediante la deconvolución de Amida I.

En la esponja E1(e) los porcentajes relativos para las estructuras identificadas fueron del 55,1% para hoja-plegada- β , 19,64 % de α -hélice y el 25,3 % giro β ; mientras que para la esponja E2 fueron 52,1 %, 36,7 % y 10,5 % respectivamente (tabla 4.4). El mayor contenido de estructura α - hélice (estructura menos rígida que la Hoja β -plana) que posee E2 en comparación con E1e, podría atribuirle al material mayor elasticidad y flexibilidad.

Tabla 4.4 Porcentaje relativo de las estructuras secundarias calculadas mediante la deconvolución del espectro FTIR ATR de la Amida I de esponjas de queratina.

Muestra	$\lambda(\text{cm}^{-1})$	Tipo de estructura secundaria	Fracción (%)
E1e	1622	Hoja β -plana	55,07
	1654	α - hélice	19,64
	1675	giro β	25,29
E2	1622	Hoja β -plana	52,77
	1651	α - hélice	36,73
	1675	giro β	10,50

En ambas muestras se evidencia una mayor proporción de estructuras tipo β (una estructura más rígida que la α), esto pudo deberse a una mayor proporción de raquis en las plumas usadas para la extracción de la queratina en el presente trabajo de Tesis. Diferentes autores han reportado que la fracción del raquis está compuesta en mayor proporción de estructuras tipo β respecto a la α , mientras que la fracción de barbas posee una mayor proporción de estructuras tipo α

respecto a la β . Sharma y col., (2018) analizaron mediante FTIR-ATR la estructura de las plumas y la queratina extraída de ellas, observando que poseen un mayor contenido de estructuras Hoja β -plana.

4.5.4 Propiedades de sorción de agua de las esponjas

Se realizaron las isotermas de sorción de agua para las esponjas de queratina en un rango de a_w de 0,11 a 0,98 y a 20 °C. Las humedades iniciales de las esponjas E1e y E2 fueron de $3,50 \pm 0,10$ y $3,41 \pm 0,62$ g / g b.h (base húmeda) respectivamente. Los resultados experimentales de los contenidos de agua de equilibrio en función de la a_w a 20 °C y el ajuste de los datos con la ecuación de GAB (Ec. 4.5) por regresión no lineal obtenidos para las esponjas de queratina E1e y E2 a 20 °C se presentan en la Figura 4.10.

Ambas isotermas siguieron el modelo sigmoideal característico de los materiales a base de queratina e indican que el agua sería absorbida en multicapas (Martelli y col., 2006; Moore y col., 2006); sin embargo, exhibieron comportamientos diferentes para valores de a_w mayores a 0,33.

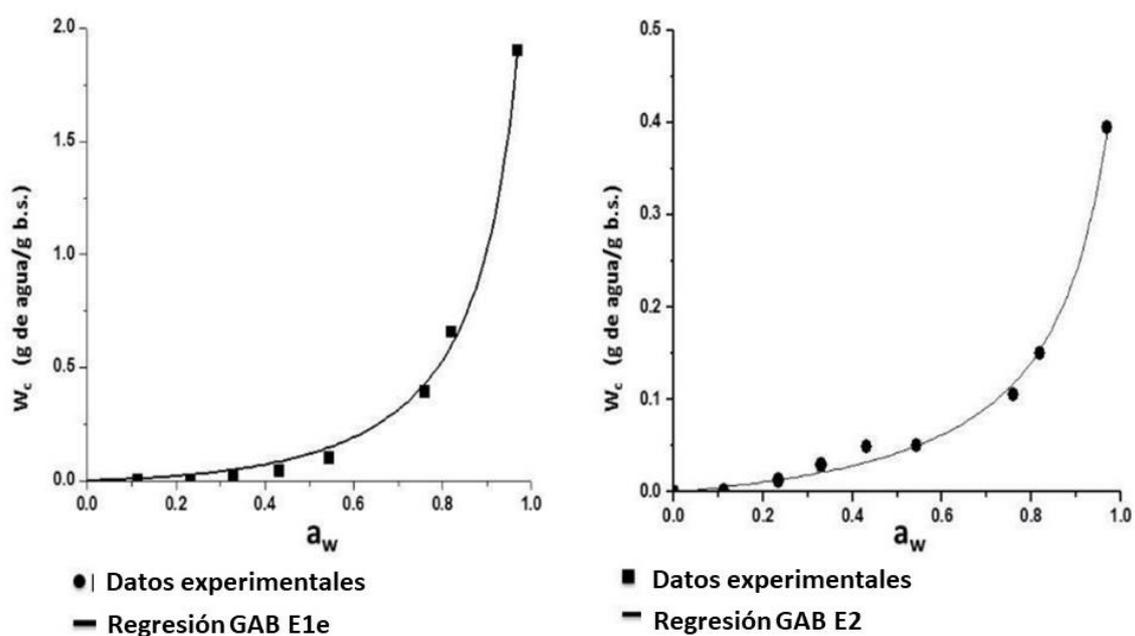


Figura 4.10 Isotermas de sorción de las esponjas de queratina E1e y E2.

Capítulo IV. Biomateriales porosos de queratina a partir de la biomasa de plumas de pollo

La Tabla 4.5 muestra los parámetros de la ecuación de GAB, el coeficiente de determinación (R^2) y el porcentaje de error medio relativo (% E).

Tabla 4.5 Parámetros de regresión no lineal (GAB) y parámetros estadísticos (R^2 y %E) de las isotermas de sorción de esponjas de queratina a 20 °C.

Parámetros (Ec. GAB)	Esponja E1e		Esponja E2	
	Valor	(ES)	Valor	(ES)
<i>W_m (g agua/ g bs)</i>	0,0149	8,4x10 ⁻⁰⁴	0,0377	0,013
<i>C</i>	3,9192	0,0236	1,2315	0,2280
<i>K</i>	0,9280	0,005	0,9021	0,0017
Parámetro estadístico				
<i>R²</i>	0,997		0,994	
<i>% E</i>	14,13		5,70	

*ES= error estándar

El modelo GAB mostró un buen ajuste a los datos experimentales de contenido de agua de equilibrio para un amplio rango de valores de a_w , presentando valores muy cercanos a 1 para el coeficiente de correlación y % E cercanos al 10 % (Tabla 4.6). La esponja E2 exhibió un valor de W_m 2,5 veces mayor que la esponja E1e; el tratamiento E1(e) genera esponjas con mayor contenido de agua de equilibrio y mayor capacidad para absorber agua en el rango de a_w evaluado.

4.5.5 Aplicación ambiental en el control de aceite y crudo

4.5.5.1 Capacidad de sorción y retención de aceite

La capacidad de sorción de aceite (CSA) y la capacidad de retención del aceite (CRA%) captado por el material sorbente, se midieron en las esponjas E1 (a-e) y E2. Los resultados obtenidos de dichos ensayos presentan en la Tabla 4.6.

Tabla 4.6. Capacidad de adsorción (CSA) y retención de aceite (CRA%) de las esponjas de queratina.

Matriz*	(CSA) (g de aceite/ g de sorbente)	(CRA%)
		
E1a	7,58±1,86 ^{ab}	25,89±2,89 ^a
E1b	6,81±1,50 ^{ab}	63,74±3,11 ^c
E1c	6,84±1,41 ^{ab}	57,05±2,83 ^c
E1d	5,59±0,90 ^a	42,11±1,41 ^b
E1e	13,79±0,56 ^{bc}	71,35±2,12 ^d
E2	20,93±3,46 ^c	72,17±2,83 ^d

Los resultados son presentados como el promedio ± desviación estándar de las muestras por duplicado. Valores con diferentes superíndices (^{a,b,c}) presentan diferencias significativas mediante la prueba de Tuckey ($\alpha=0,05$). *Esponja **E1e** sumergida en aceite de girasol.

Las esponjas E1e y E2 presentaron la mayor capacidad de adsorción de aceite con valores de 13,79 y 20,93 g de aceite/g sorbente, respectivamente; al mismo tiempo estas esponjas exhibieron valores de 71 a 72 % de capacidad de retención de aceite sin observarse diferencias significativas entre ambos tratamientos ($p > 0,05$, Tabla 4.6). Para las esponjas obtenidas a partir de las

extracciones E1a a E1d se observan valores de capacidad de adsorción y retención de aceite significativamente inferiores ($p < 0,05$)

4.5.5.2 Ensayos de sorción de crudo

Los derrames de crudo debidos a la exploración de recursos, transporte, almacenaje, entre otras actividades, causan un daño considerable generando un impacto negativo en el medio ambiente. Se evaluó la captación de crudo ($\delta = 0,885$ g/L) (CSC; g crudo/ g queratina) y el porcentaje de retención de crudo (%CRC), para las esponjas E1e y E2 (figuras 4.11 y 4.12).



Figura 4.11 Capacidad de sorción de crudo (CSC) de las esponjas E1e y E2.

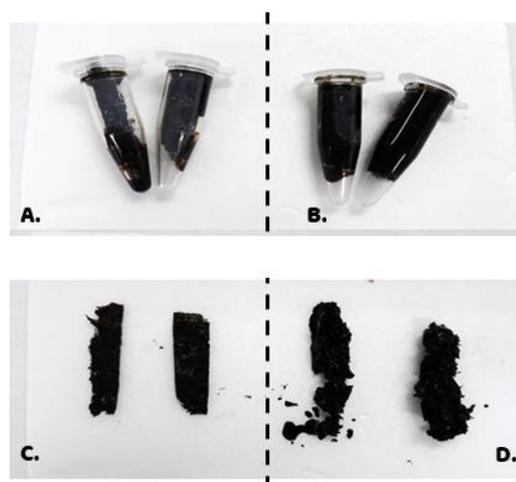


Figura 4.12 Capacidad de sorción de petróleo (%CRC) de las esponjas de queratina E1e y E2.

Capítulo IV. Biomateriales porosos de queratina a partir de la biomasa de plumas de pollo

La esponja E2 presentó un mejor desempeño como material adsorbente de crudo en comparación con la esponja E1 ($p < 0,05$; Tabla 4.7). El buen desempeño de la adsorción de hidrocarburos de las esponjas de queratina obtenidas a partir de plumas de pollo podría ser explicado por el carácter hidrofóbico y la insolubilidad en agua propia de las queratinas siendo afín químicamente con los hidrocarburos; además del área específica del biopolímero debida a los espacios intersticiales formados por la red de fibras de queratina (Roig y col., 2003).

Tabla 4.7. Capacidad de sorción (CSC) y retención de crudo (%CRC) de las esponjas de queratina.

Matriz	CSC (g de crudo/ g de sorbente)	CRC (%)
E1e	5,87±0,56 ^a	47±13,23 ^a
E2	21,22±1,35 ^b	78±5,24 ^b

*Los resultados son presentados como el promedio \pm desviación estándar de las muestras por duplicado. Valores con diferentes superíndices (^{a,b,c}) presentan diferencias significativas mediante la prueba de student ($\alpha=0,05$).

4.5.6 Modificación del proceso de formación de esponjas

Debido al interés en escalar a nivel industrial el proceso de formación de esponjas obtenidas a partir de queratina de plumas de pollo, se propuso estudiar la viabilidad de introducir modificaciones en el proceso de obtención que permitieran una reducción en los costos y la optimización del proceso. Para este fin se modificaron los protocolos de extracción basados en Zhou y col., (2014) y Tonin y col., (2010). Las modificaciones consistieron en eliminar la etapa de diálisis y reemplazar la etapa de liofilización por un secado con convección forzada a 60 °C por 24 h en una estufa Sanjor serie SL DB (Buenos Aires,

Capítulo IV. Biomateriales porosos de queratina a partir de la biomasa de plumas de pollo

Argentina), ya que dicha etapa resulta costosa para el tratamiento de un subproducto. Sin embargo, como resultado del proceso modificado, se obtuvieron esponjas de queratina muy quebradizas, con fuerte olor a sulfuros y de rápida disolución en agua, esto pudo deberse a un excesivo remanente de reactivos, que impide un nuevo entrecruzamiento de las cadenas polipeptídicas.

La hipótesis radica en que dichas etapas resultan costosas para ser el proceso de revalorización de un subproducto para aplicación en tratamiento de derrames de aceite o crudo. Como resultado de las modificaciones incluidas, se obtuvieron esponjas de queratina con una estructura más quebradiza y caracterizada por el fuerte olor a sulfuros, además de presentar una rápida disolución en agua y mayor contenido de proteína soluble; lo anterior pudo deberse a que al eliminar la etapa de diálisis puede quedar un excesivo remanente de reactivos y limitar el correcto entrecruzamiento de las cadenas polipeptídicas. Sin embargo, estas esponjas presentaron un buen performance en la adsorción de aceites con porcentajes de retención de 78 y 70 %.

En el análisis térmico para las esponjas sin etapa de diálisis (SD), se observó un primer pico endotérmico a $46,5 \pm 0,3$ °C y $52,3 \pm 2$ °C para E1c (SD) y E1e(SD) respectivamente ($p > 0,05$), con entalpías de $3,4 \pm 0,0$ J/g para E1c (SD) y $8,8 \pm 0,5$ J/g para E1e (SD). Cabe señalar que no se obtuvieron esponjas adecuadas para analizar a partir de las muestras E2 sin etapa de diálisis. Las transiciones observadas a temperaturas inferiores a 100 °C podrían atribuirse a la evaporación de agua libre presente en las esponjas (Martínez-Hernández y col., 2005; Patrucco y col, 2015). La temperatura de pico disminuyó significativamente

Capítulo IV. Biomateriales porosos de queratina a partir de la biomasa de plumas de pollo

cuando se elimina la etapa de diálisis observándose en un rango entre 110 a 188 °C; este comportamiento puede ser atribuido a la presencia de reactivos como la urea que no fueron eliminados y que pueden desestabilizar la estructura principal de la pluma, mediante la destrucción de los puentes de hidrógeno (Takahashi y col., (2004).

En conclusión, para los procesos para la formación de esponjas de Tonin y col., (2010) y Zhou y col., (2014) modificados no se recomienda eliminar la etapa de diálisis, ya que el disminuye la calidad y funcionalidad del biomaterial obtenido.

4.6 PARTE B: Síntesis de materiales biosorbentes de queratina aplicando L-cisteína/Urea sin diálisis.

L-cisteína es un α -aminoácido cuya fórmula es **HS-CH₂-CHNH₂-COOH**. Se trata de un aminoácido no esencial, que puede utilizarse como agente reductor para sustituir a los reactivos tóxicos como el 2-MEC típicamente utilizados en la extracción de queratina.

La urea, por su parte, es un agente desnaturalizante que puede romper los enlaces de hidrógeno presentes en la proteína y exponer los enlaces S-S. Lo anterior, permite desnaturalizar la estructura cristalina y compacta de la proteína, volviendo el material amorfo y dejando los enlaces disulfuro expuestos y facilitando el acceso para que la L-cisteína rompa dichos enlaces. Como resultado se obtiene queratina reducida (Figura 4.13).

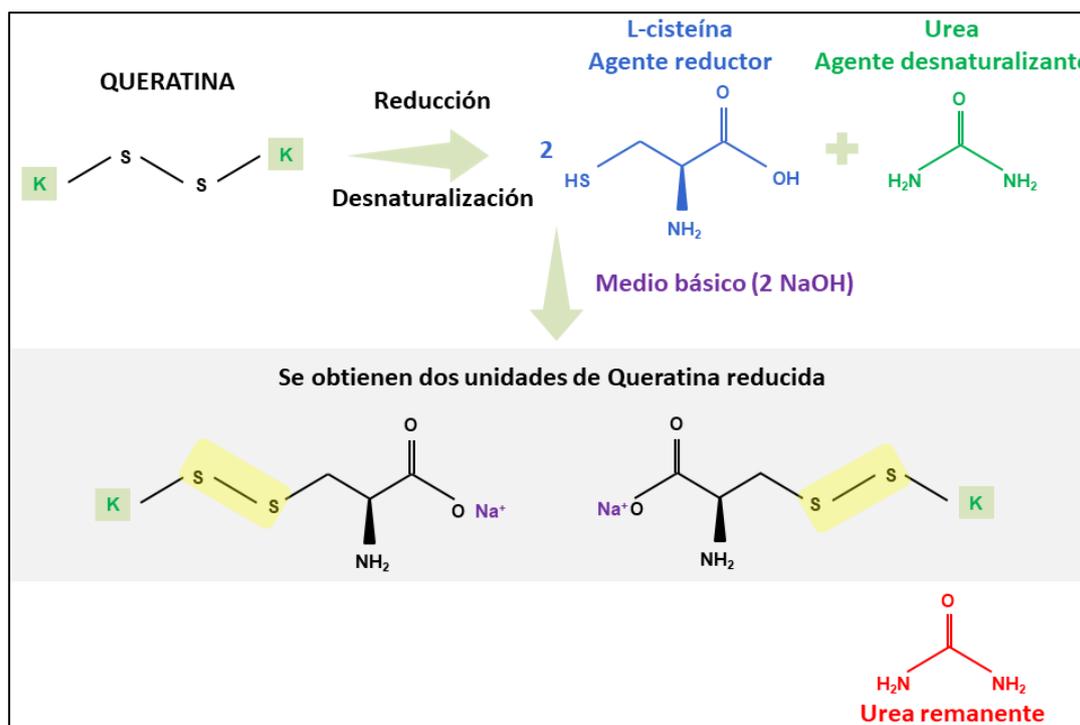


Figura 4.13. Esquema de las reacciones químicas dadas en el proceso de solubilización de plumas de pollo con mezclas de L-cisteína/Urea en medio básico.

4.6.1 Procedimiento de extracción de queratina

En esta metodología, para romper los puentes disulfuro presentes en la proteína se empleó la urea como agente de hinchamiento para desnaturalizar la proteína de estructura cristalina pasando a una estructura amorfa, exponiendo los enlaces disulfuro y dejándolos disponibles para que el aminoácido L-cisteína actúe como agente reductor.

Para la extracción de queratina a partir de plumas de pollo acondicionadas se mezclaron en relación 1:20 (m/v) con soluciones que contenían urea (NH_2CONH_2) y el aminoácido L-cisteína. La concentración de urea se modificó entre 2 y 8M mientras que la concentración de L-cisteína se mantuvo fija a 0,165 M; el pH de las soluciones se ajustó a 10,5 con NaOH 2M. Estas mezclas se agitaron a 60 °C durante 3 h con agitación constante, las dispersiones obtenidas

Capítulo IV. Biomateriales porosos de queratina a partir de la biomasa de plumas de pollo

se centrifugaron a 3000 rpm 10 °C y 10 min para separar el material no disuelto obteniendo soluciones de queratina.

Con el objetivo de obtener la proteína sin usar diálisis se procedió a la etapa de precipitación y lavado; la misma consistió en un ajuste del pH de las soluciones a 4,2 adicionando lentamente HCl concentrado, seguido de una fase de reposo a temperatura ambiente durante 2 horas; a continuación, se agregó agua Milli Q y se observó la aparición de un hidrogel blanquecino correspondiente a la queratina obtenida, (Figura 4.14). Se repitieron 5 ciclos de lavados y filtrados de la proteína con el fin de eliminar la sal producida en este proceso.

Como control de lavados se determinó la proteína soluble en el agua de lavado mediante el método espectrofotométrico de Biuret.

Formación de esponjas de queratina: La proteína obtenida se centrifugó a 3000 rpm y 10 °C por 10 min y se congeló a -40 °C para ser posteriormente tratada por liofilización en un equipo HETO Modelo FD 4 (Figura 4.14). La queratina liofilizada se almacenó a 4 °C y en oscuridad.

Uno de los principales objetivos del diseño e implementación de esta metodología radica en la necesidad de simplificar y economizar en el proceso; para esto se propuso reemplazar la etapa de purificación de la queratina por diálisis, lo cual implica el uso de membranas de diálisis de alto costo, por la inclusión de una etapa conjunta de precipitación, tiempo de reposo y lavados con agua Milli-Q.

Capítulo IV. Biomateriales porosos de queratina a partir de la biomasa de plumas de pollo



Figura 4.14. Esquema del proceso de obtención de las esponjas a base de queratina mediante el uso de L-cisteína y Urea.

Esta alternativa permitió eliminar la diálisis del proceso y en conjunto con el secado por liofilización se logró el ensamblado 3D de la proteína y la formación de las esponjas, que resultaron en materiales porosos, blanquecinos e inodoros (figura 4.15).



Figura 4.15 Productos obtenidos en cada etapa del proceso: a) Queratina soluble, b) Hidrogeles de queratina, c) Esponjas de queratina.

4.6.2 Evaluación del rendimiento de extracción

Se evaluaron diferentes condiciones de extracción modificando las condiciones de procesamiento como el tiempo y la temperatura de reacción, así como la relación de urea presente en las mezclas de extracción.

El aumento de la concentración de la urea en las mezclas de extracción contribuyó significativamente en el proceso de solubilización de las plumas y extracción de la queratina (Figura 4.16). Se identificó que las mejores condiciones para la solubilización de las plumas de pollo sin alterar la cadena primaria de la proteína implican una relación de 8M urea, 0,165M de L-cisteína a 60 °C durante 3 h, que conducen a mayor rendimiento de extracción y mayor cantidad de proteína soluble, alcanzando un 68 % y 0,168 g de proteína soluble / g pluma, respectivamente. Los resultados aquí obtenidos concuerdan con los publicados por Pourjavaheri y col., (2019) y Ma y col., (2016) para solubilizaciones de plumas de pollo con L-cisteína.

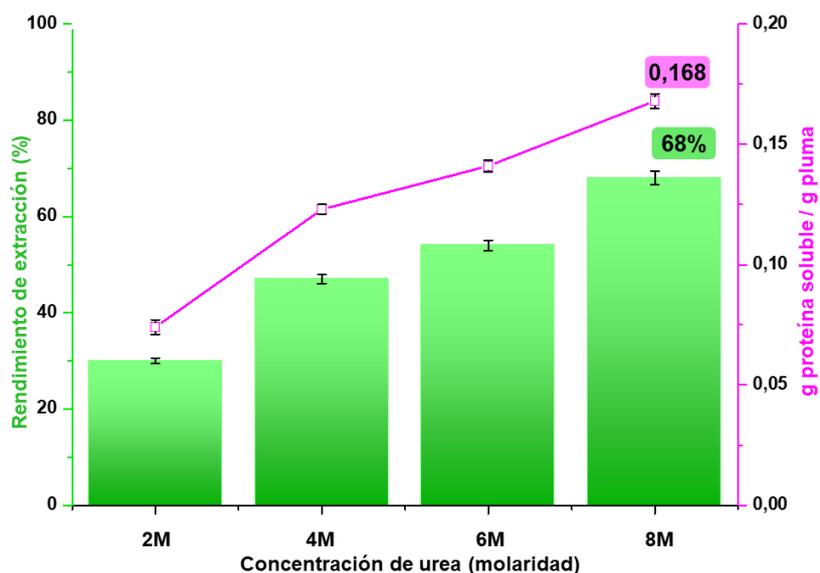


Figura 4.16. Variación de los rendimientos de extracción de queratina porcentual y proteína soluble obtenidos con la metodología de extracción L-cis/Urea; modificando la concentración de urea. T= 60 °C y t= 3 h.

4.6.3 Caracterización fisicoquímica de los biomateriales

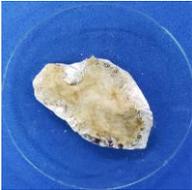
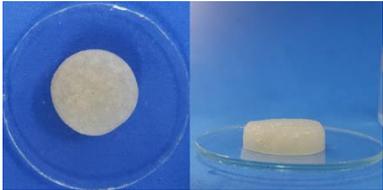
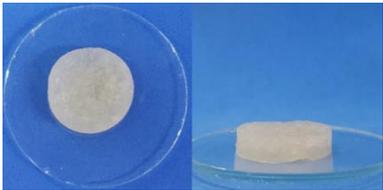
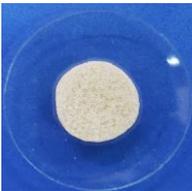
4.6.3.1 Hinchamiento, solubilidad de las esponjas y liberación de proteína al medio acuoso.

Se evaluó la capacidad de hinchamiento (C_H , g agua/ g material), la solubilidad gravimétrica (%Sol, g material soluble / 100 g material) y la proteína liberada (g proteína / g material) en medio acuoso en un rango de pH de 3 a 12, de las esponjas de queratina. Se cortaron discos de $23,18 \pm 0,25$ mm de diámetro y $5,49 \pm 0,66$ mm de espesor; se dispuso cada disco en soluciones acuosas correspondientes a un valor de pH: 3, 5, 7, 9, 12 y se agitaron a 150 rpm durante 1 h a 25 °C. Una vez terminado el ensayo se registraron los pesos de cada disco (esponjas húmedas); finalmente se secaron a 105 °C hasta peso constante (esponjas secas).

Las esponjas no se desintegran ni pierden su forma inicial en medios acuosos de pH < 9 tras una exposición de 1 h a 25 °C; además, la solubilidad del biomaterial en estas condiciones no supera el 6,51 % (Tabla 4.8). Sin embargo, si el material se expone a pH>9 se observa un cambio significativo en la solubilidad del mismo (Tabla 4.8); la mayor alcalinidad del medio incrementa la solubilidad de la esponja a un 51,21% y la pérdida total de la estructura inicial del disco. Este comportamiento podría deberse a la tendencia a la hidrólisis que presenta la queratina a valores de pH>9.

Capítulo IV. Biomateriales porosos de queratina a partir de la biomasa de plumas de pollo

Tabla 4.8. Capacidad de hinchamiento, porcentaje de solubilidad y proteína liberada al medio de las esponjas de queratina a diferentes valores de pH. Imágenes de las esponjas húmedas (fin del ensayo) y secas (fin de secado).

pH	Esponjas húmedas	C_H (g agua / gsecas esponja)	Esponjas	%Sol	Proteína liberada
12		$17,68 \pm 2,08^b$		51,21 ^c	$0,0110 \pm 0,01$
9		$13,55 \pm 0,75^a$		24,36 ^b	nl
7		$13,27 \pm 1,34^a$		6,51 ^a	nl
5		$13,51 \pm 1,28^a$		5,76 ^a	nl
3		$13,15 \pm 1,16^a$		5,10 ^a	nl

nl: no libera.

En el caso de la proteína soluble, solo se identificó en el caso de las esponjas sometidas a pH 12 (tabla 4.8).

La capacidad de hinchamiento (C_H) presentó valores entre 13,15 – 13,55 g de agua /g de esponja a pH 3-9 sin diferencias significativas ($p > 0,05$); mientras que a pH= 12 se registró una captación significativamente mayor de 17,68 g de agua/ g esponja ($p < 0,05$).

4.6.3.2 Propiedades térmicas

Se evaluaron las propiedades térmicas de las esponjas mediante calorimetría diferencial de barrido con un equipo DSC Q100 (TA Instruments, USA); la velocidad de calentamiento aplicada fue 10 °C/min y la rampa de 0 a 300 °C. En la figura 4.17 se presenta el termograma de calentamiento obtenido; las esponjas presentaron gran estabilidad térmica con transiciones térmicas a 217 °C y un valor de entalpía de 114,7 J/g; similares a los previamente registrados para otros biomateriales obtenidos en esta investigación y con los rangos de desnaturalización de las plumas de pollo (170-210 °C) Takahashi y col., (2004). Se observa un pequeño pico endotérmico a una temperatura mayor; este se podría atribuir a un ΔH_d de la transición de las estructuras tipo α -hélice cristalinas. En esponjas obtenidas a partir de lana los rangos reportados para estas transiciones térmicas fueron entre 230-240 °C (Patrucco y col., 2016)

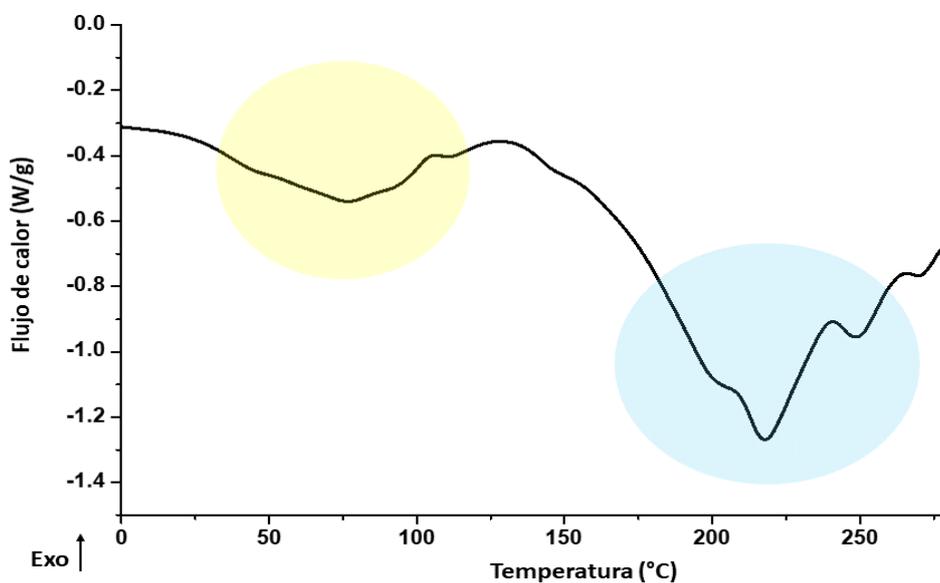


Figura 4.17. Termograma de calentamiento de las esponjas de queratina obtenidas mediante reducción con L-cisteína/urea en medio básico.

Capítulo IV. Biomateriales porosos de queratina a partir de la biomasa de plumas de pollo

En el termograma de la Fig. 4.17 se identificó una transición endotérmica entre 50-100 °C. Patrucco y col. (2016) registraron para este rango la posible evaporación de agua; Posati y col. (2016) reportaron para esponjas de queratina tres etapas térmicas principales: un pico por debajo de 100 °C relacionado con la evaporación del agua, una transición entre 195 °C y 200 °C relacionada con la degradación de fracciones de queratina de bajo peso molecular con baja estabilidad térmica, y un pico endotérmico entre 210 °C y 250 °C, relacionado con la descomposición de las zonas cristalinas. Estos resultados soportan los obtenidos en esta investigación para las esponjas de queratina de plumas de pollo.

La estabilidad térmica de las plumas acondicionadas y de las esponjas de queratina se realizó a través del análisis termogravimétrico (TGA) realizado en un equipo Thermo Plus EVO2 (Japón); la velocidad de calentamiento fue 10 °C/min hasta 700 °C. Como se observa en la figura 4.18.A las esponjas de queratina presentan una tendencia similar en el proceso térmico de tres etapas, lo que indica que se ha conservado la estabilidad térmica de la biomasa de plumas de pollo original en el biomaterial obtenido. Se calculó la curva derivada de la masa (DTG; figura 4.18.B) y se evaluaron las temperaturas correspondientes al %PP máximo en cada etapa (I, II, III) (Ullal y col., 2011).

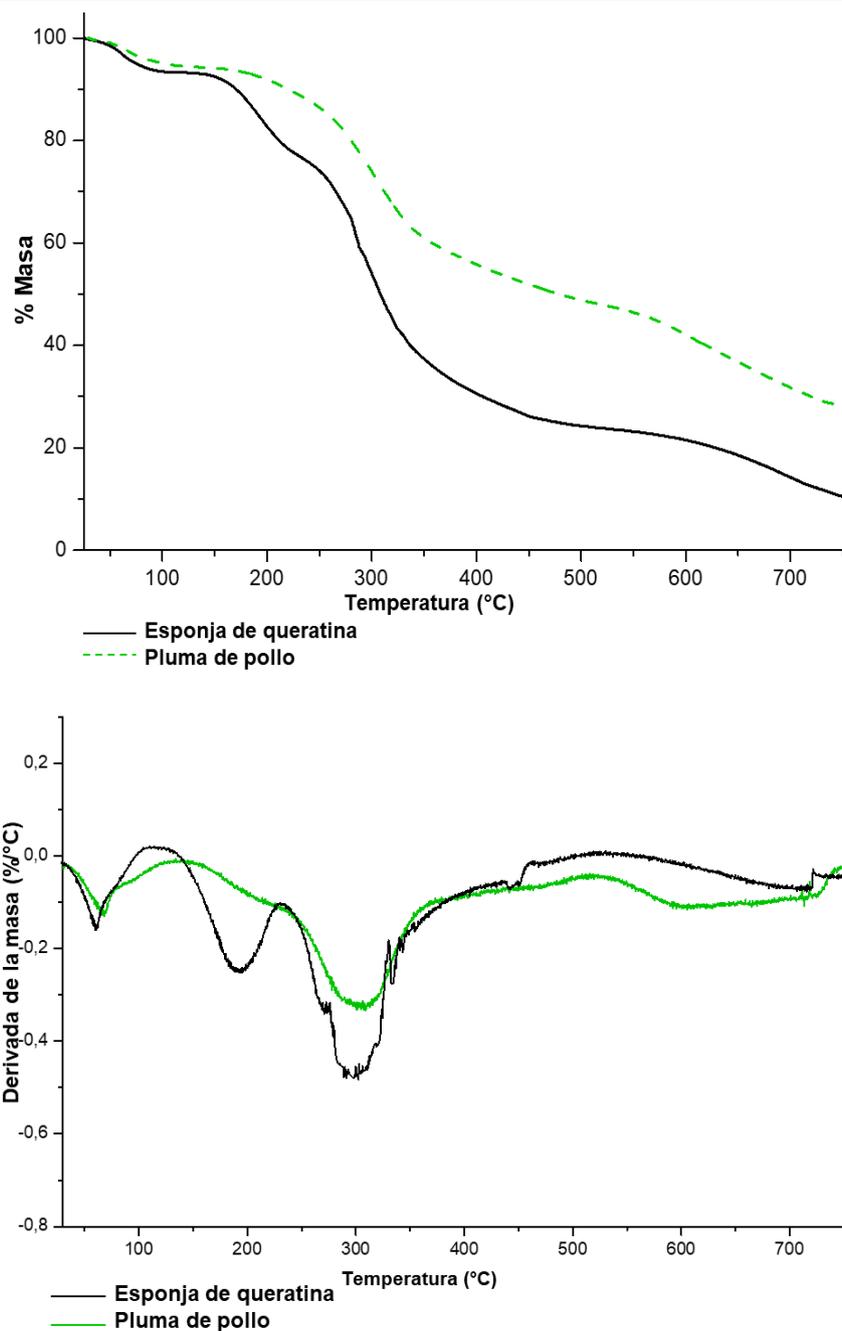


Figura 4.18. A) Análisis termogravimétrico (TGA); **B)** 1^{ra} derivada (DTG) para las plumas de pollo y las esponjas de queratina.

En la tabla 4.9 se presentan los datos termogravimétricos para el proceso de descomposición de las plumas de pollo y de las esponjas de queratina.

En la etapa 1 se registró una baja pérdida de peso del 6,24 % antes de superar la temperatura de 100 °C (tabla 4.9), esto se puede atribuir a la evaporación de

Capítulo IV. Biomateriales porosos de queratina a partir de la biomasa de plumas de pollo

agua presente como agua libre tanto en la biomasa como en las plumas de pollo. Las muestras son estables hasta los 200 °C, y se produce una abrupta pérdida de peso a 200-400 °C con un rango de disminución que alcanza el 70 %. Esto se puede asociar a la desnaturalización de la estructura hélice y la destrucción de la estructura secundaria.

Tabla 4.9 Etapas del proceso de descomposición térmica de las plumas de pollo y de las esponjas de queratina. Porcentaje de pérdida de peso (%Pp) y temperatura máxima para cada etapa; temperatura a la que se alcanzó el 5 %Pp y %Pp a 300 °C

Muestra	Etapa I (20-150 °C)			Etapa II (150 a 500 °C)			Etapa III (> 500 °C)	
	% Pp	T _{máx}	T _{5%} de %Pp	% Pp	T _{máx}	%Pp a 300°C	%Pp	T _{máx}
Plumas	5,80*	140*	101,85*	41,9*	444,8*	26,10*	24,10*	749*
Esponjas	6,24	91	75,17	69,4	495,6	46	12,93	735,6

*Valores que difieren significativamente ($\alpha= 0,05$) según la prueba de student.

La segunda etapa de pérdida de peso que ocurre entre los 150 a 500 °C, representó una mayor pérdida de peso representando un 41,9 % para las plumas y un 69,4 % para las esponjas de queratina del total del peso perdido (tabla 4.9); en el caso de las esponjas el 69,4 % se pudieron discriminar dos fases de pérdida

Capítulo IV. Biomateriales porosos de queratina a partir de la biomasa de plumas de pollo

de peso, una correspondiente al 17,50 % (100-150 °C) seguido del 51,90 % (250-500 °C). Los valores reportados en la etapa II pueden ser asociados a la degradación de la estructura helicoidal de la queratina (Martinez-Hernandez y col., 2005; Pourjavaheri y col., 2019). Pourjavaheri y col., (2019), indicaron para un 70 %Pp en esta etapa para queratina extraída con L-cisteína/urea, sin embargo, en un rango más acotado correspondiente a 230-280 °C. Los autores lo asociaron a la descomposición de la urea remanente en la muestra. Finalmente, en la tercera etapa enmarcada en el rango de 500 a 750 °C las plumas alcanzan el 71,8 %Pp total y las esponjas el 88,55 %Pp.

4.6.3.3 Análisis de la microestructura y morfología

Los espectros infrarrojos (FTIR-ATR) se obtuvieron con un espectrómetro Nicolet IS10 (Thermo- Scientific) (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA) con accesorio de ATR (diamante) en un rango 4000 a 400 cm^{-1} . El espectro FTIR-ATR de la esponja de queratina (Figura 4.19) evidencia la presencia de las bandas Amida I (1690-1600 cm^{-1}), Amida II (1575-1480 cm^{-1}) y la señal correspondiente a la oxidación de la cisteína (1200-1040 cm^{-1}), estos datos son consistentes con los reportados para plumas de pollo (Ma y col., 2016).

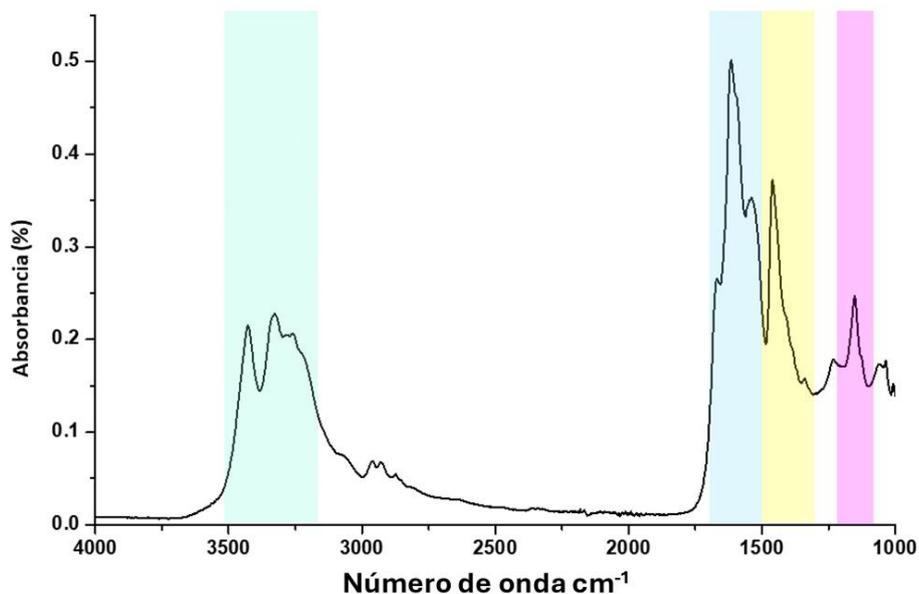


Figura 4.19. Espectro FTIR-ATR de la esponja de queratina obtenida mediante reducción con L-cisteína/Urea.

En la evaluación de la deconvolución de la Amida I (figura 4.20) se detectaron los componentes correspondientes a la estructura α -hélice (1657 - 1651 cm^{-1}), hoja plegada- β (1631 - 1621 cm^{-1}) y de estructuras desordenadas (1697 - 1670 cm^{-1}), representando un $94,7/2,7/2,6\%$ para las esponjas obtenidas mediante esta metodología, teniendo mayor proporción de estructuras tipo β .

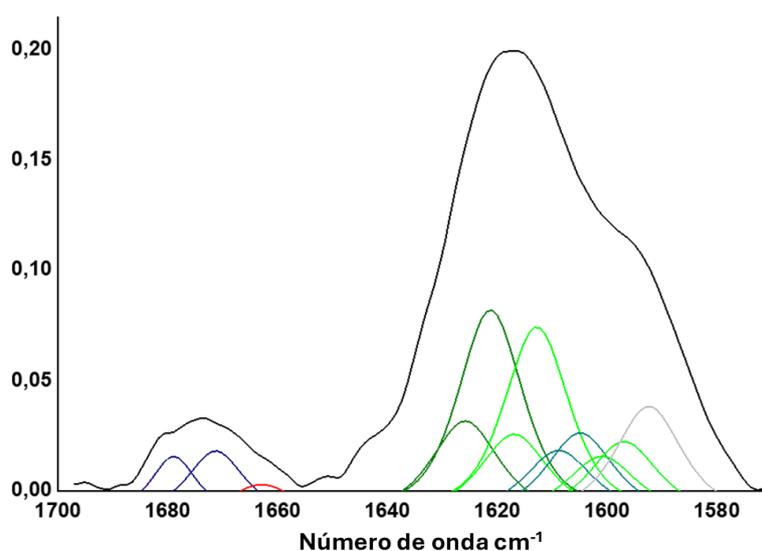


Figura 4.20. Banda Amida I y curvas gaussianas obtenidas mediante la deconvolución del espectro FTIR-ATR de la esponja de queratina.

Capítulo IV. Biomateriales porosos de queratina a partir de la biomasa de plumas de pollo

La caracterización morfológica de las esponjas fue analizada por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM) usando un microscopio FEI modelo Quanta 200 (Países Bajos). La figura 4.21.A y B muestra las micrografías SEM que permiten analizar la morfología de la esponja de queratina; se observa que el material está conformado por una microestructura heterogénea porosa con una superficie rugosa. Estos resultados concuerdan con los reportados por los autores Tachibana et al. (2002) y Zhou et al. (2014) para esponjas de queratina regenerada.

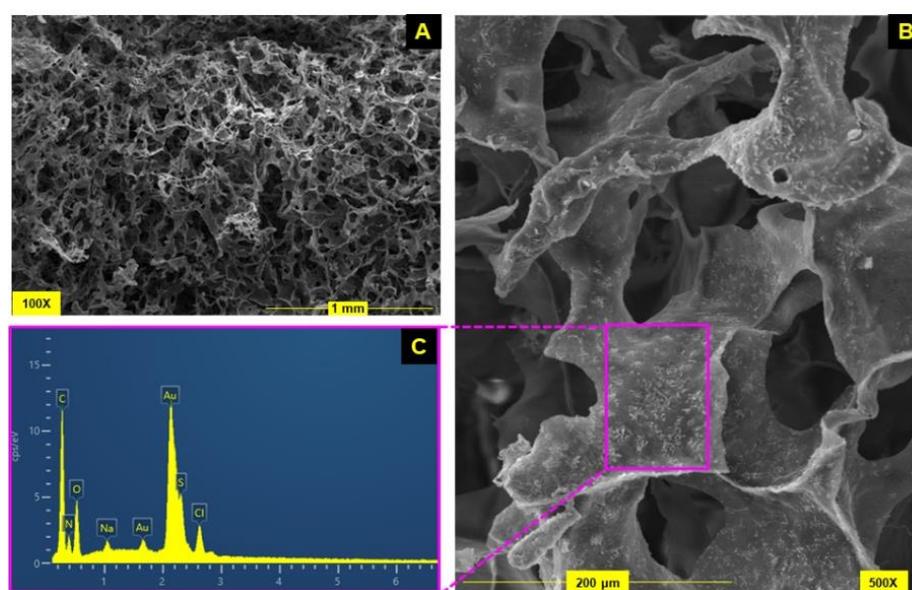


Figura 4.21 Micrografías SEM de las esponjas de queratina, magnificación de 100X y 500X (A y B). C) Análisis de componentes presentes en la esponja.

El análisis de la composición elemental de la esponja se presenta en la figura 4.21.C indica que la esponja tiene la siguiente composición elemental: C (55,6 %), O (21,9%), S (2,1 %), Cl (0,9 %), Na (0,24 %) y N (19,3 %). La presencia de Cl se asocia al HCl utilizado para precipitar la proteína, por otra parte, el sodio puede asociarse al uso de NaOH para ajustar el pH a 10,5 en la etapa de solubilización de las plumas. Sharma y col., (2018) indicaron que la composición de las plumas de pollo y películas de queratina reducida con Na₂S incluye C, O,

Na, Al, S, Ca y Cu; además que las proporciones de peso asociadas al S fueron 36,2 y 15,43 %, 0,58 y 6,57 % de Na para las plumas y la queratina reducida, respectivamente, asociadas al agente reductor empleado.

4.6.3.4 Determinación del peso molecular

El análisis de las masas moleculares (MM) se realizó mediante la electroforesis en gel de Tricina/SDS-PAGE. Para este propósito se evaluó la esponja sin y con pretratamiento de reducción previo a la electroforesis que consistían en incubar a 100°C por 3 min en condiciones reductoras (DTT 1% m/v). En la figura 4.22 se presenta el gel Tricina/SDS-PAGE de las esponjas de queratina obtenidas por reducción con L-cisteína/urea. A. Sin pretratamiento; B. pretratamiento 1 % DTT, 100 °C, 3 min. Los carriles de los extremos corresponden a los marcadores de peso molecular empleados de bajo (LMW) y ultrabajo peso molecular (ULMW).

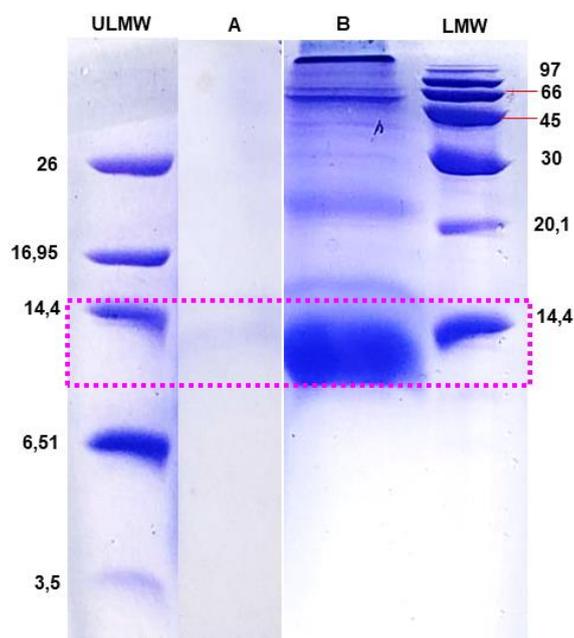


Figura 4.22. Gel Tricina/SDS-PAGE de las esponjas de queratina obtenidas por reducción con L-cisteína/urea. **A.** Sin pretratamiento; **B.** Pretratamiento 1 % DTT, 100 °C, 3 min. Los carriles de los extremos corresponden a los marcadores de peso molecular empleados (LMW y VLMW).

Capítulo IV. Biomateriales porosos de queratina a partir de la biomasa de plumas de pollo

En la muestra sin reducir (carril a) se observa una ligera banda proteica a 14,4 kDa (monómero) por lo que la masa molecular de la esponja de queratina regenerada es similar a la reportada para las plumas de pollo estimada en 10 kDa (Poole y col., 2009). En la muestra reducida (carril B) la banda monomérica a 10-14,4 kDa se intensifica y se pueden observar otras bandas a 20-22 kDa (dímeros) y 66 kDa. Poole y col., 2009 indicaron para queratina de lana, la presencia de proteína de filamentos intermedios de bajo contenido de azufre y con un rango de 40-60 kDa. La ausencia de fracciones por debajo de 14,4 kDa sugiere que la cadena primaria de la queratina se mantuvo intacta en las condiciones de procesamiento aplicadas.

Varios autores concuerdan con que las queratinas provenientes de plumas tienen un importante grupo de bandas cercanas a 10–14,4 kDa, representando la masa molecular de la queratina concentrada en este tipo de biomasa. La intensidad de las bandas puede alterarse según el método de extracción empleado. Pourjavaheri y col., (2019) reportaron la variación en la intensidad de las bandas de queratina extraída con Na₂S en comparación a las extraídas con L-cisteína y urea, asimismo, indicaron que en ambos casos el peso molecular fue 11 kDa aproximadamente.

4.6.3.5 Isotermas de sorción

Se determinó la isoterma de sorción de vapor de agua para la esponja a 20°C y en un rango de $a_w = 0,11-0,96$; se analizaron diferentes modelos no lineales correspondientes a ecuaciones de 2 parámetros (BET, Halsey y Oswin) y 3 parámetros (Guggenheim-Yerson-de Boer (GAB); Ec. 4.2) y se comparó la bondad del ajuste a los datos experimentales.

Capítulo IV. Biomateriales porosos de queratina a partir de la biomasa de plumas de pollo

A continuación, se presentan las ecuaciones y parámetros correspondientes a los otros modelos aplicados.

$$\text{BET (Brunauer-Emmett-Teller)} \quad W_c = \frac{W_m C a_w}{(1 + C a_w)} + \frac{W_m a_w}{(1 - a_w)} \quad (\text{Ec. 4.6})$$

donde W_m es la humedad del material que corresponde a la situación en que los puntos de adsorción primarios están saturados por moléculas de agua. C_{BET} es la constante de BET, característica del material.

$$\text{OSWIN:} \quad W_c = A \left[\frac{a_w}{(1 - a_w)} \right]^B \quad (\text{Ec. 4.7})$$

Donde, A y B: constantes del modelo, características para cada material.

$$\text{HALSEY:} \quad W_c = \left[\frac{A}{\ln(1/a_w)} \right]^{\frac{1}{B}} \quad (\text{Ec. 4.8})$$

Donde, A y B: constantes del modelo, características para cada material.

Los parámetros se estimaron mediante regresión no lineal de los datos experimentales con los programas Origin Pro-v 8.0 (OriginLab Corp., Northhampton, MA USA). La selección del modelo más apropiado se basó en su bondad de ajuste, evaluada mediante el porcentaje de error medio relativo (%E) (Ec. 4.3). En la Figura 4.23 se presentan los datos experimentales de la W_{eq} y los diferentes modelos aplicados. La isoterma de sorción de este biomaterial conserva la característica típica sigmoideal de la queratina presente en las plumas de pollo y de otros biomateriales previamente estudiados, indicando que el agua es sorbida en multicapas (Martelli y col., 2006).

Capítulo IV. Biomateriales porosos de queratina a partir de la biomasa de plumas de pollo

Para el análisis de los datos experimentales se modelaron ecuaciones de 3 parámetros como GAB y de 2 parámetros como, Halsey y Oswin. Los valores obtenidos y los parámetros estadísticos se presentan en la tabla 4.11. El modelo de BET no ajustó satisfactoriamente los datos experimentales

El modelo de GAB mostró el mejor ajuste a los datos experimentales de contenido de agua de equilibrio y a_w , seguido de los modelos de Oswin y Halsey respectivamente. Del modelo de GAB se pudo determinar que el W_m para este material fue de 0,060 g de agua / g de esponja (b.s); siendo significativamente mayor a los reportados para las esponjas obtenidas mediante sulfitolisis en el presente capítulo (Parte A).

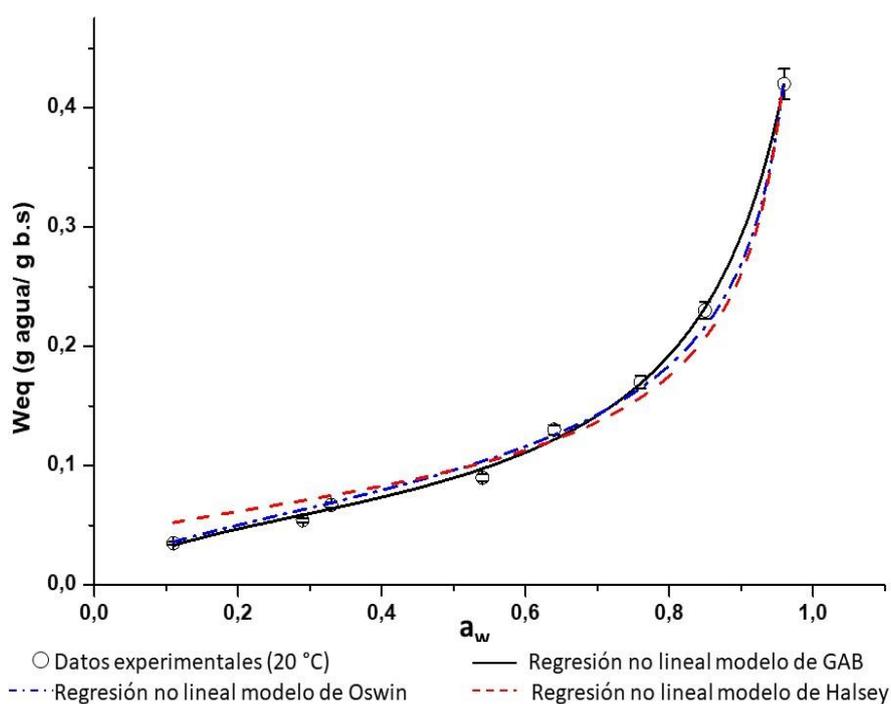


Figura 4.23. Datos experimentales de sorción de vapor de agua (20°C, $a_w=0,11-0,96$) y las regresiones no lineales de las ecuaciones de GAB, Oswin y Halsey.

Capítulo IV. Biomateriales porosos de queratina a partir de la biomasa de plumas de pollo

Tabla 4.11 Parámetros de regresión no lineal de las ecuaciones de GAB, Halsey y Oswin, parámetros estadísticos (R^2 y %E) de las isotermas de sorción de esponjas de queratina a 20 °C.

Modelo	Parámetro	Valor	error	R^2	%E
GAB	$W_{m(GAB)}$	0,060	0,003	0,998	3,861
	$C_{(GAB)}$	9,862	3,385		
	$K_{(GAB)}$	0,908	0,005		
HALSEY	$A_{(HALSEY)}$	0,009	0,002	0,943	11,694
	$B_{(HALSEY)}$	1,711	0,183		
OSWIN	$A_{(OSWIN)}$	0,096	0,004	0,994	5,977
	$B_{(OSWIN)}$	0,468	0,015		

4.6.3.6 Análisis textural

El análisis de perfil de textura de las esponjas se aplicó para evaluar la resistencia a la compresión; se midió la dureza, elasticidad, fracturabilidad y respuesta a la deformación, en un texturómetro (Brookfield Engineering Labs, Inc.) a 25 °C. Los ensayos se realizaron por quintuplicado usando discos $D=23,18\pm 0,25$ mm y $e=5,49\pm 0,66$ mm, se colocaron entre placas paralelas y se comprimieron un 40 % dos veces usando una velocidad de carro de 0,5 mm/s con una sonda TA4/1000 y una celda de carga de 25 kg. Los datos se analizaron mediante el software TexturePro CT V1.4 Build 17. En la tabla 4.12 se presenta el gráfico del perfil de compresión del biomaterial y los parámetros determinados. El parámetro dureza correspondiente a la cantidad de fuerza requerida para comprimir la matriz porosa, en el primer ciclo tuvo un valor de 65,34 N y de 58,54 N en el segundo ciclo, con una recuperación de más del 90 %; no se registraron fracturas tras la compresión indicando que este material tiene buena resistencia a la deformación.

Capítulo IV. Biomateriales porosos de queratina a partir de la biomasa de plumas de pollo

Tabla 4.12 Perfil de textura de las esponjas de queratina obtenidas por reducción con L-cisteína/Urea: Dureza (N) y cohesividad (N)

Gráfico de TPA	Parámetro textural	Valor (N)
	Dureza 1 ^{er} ciclo	65,34±0,38
	Dureza 2 ^{do} ciclo	58,54±2,70
	Nº de fracturas	0
	Elasticidad	1,24±0,02
	Cohesividad	0,35±0,02

4.6.4 Aplicación ambiental: captación de crudo

Como aplicación se evaluó el comportamiento del biomaterial como sorbente de hidrocarburos, partiendo de la hipótesis de que los residuos hidrofóbicos presentes en la queratina tienen la capacidad de captar crudo. Para este fin se estudió la capacidad de sorción y retención (ecuación 4.4 y 4.5; Parte A, Cap. IV) de a) crudo puro y b) mezclas agua/crudo aplicando las metodologías citadas en la parte A del presente capítulo.



Figuras 4.24 Discos de esponjas de queratina obtenidas por reducción con L-cisteína/urea antes y después de la captación de crudo.

Capítulo IV. Biomateriales porosos de queratina a partir de la biomasa de plumas de pollo

La capacidad de sorción medida a 5 minutos fue de $9,01 \pm 0,18$ g de crudo/ g esponja (b.s) y una capacidad de retención de 74,4 %, valores superiores a los reportados para las plumas de pollo 6,1 g de crudo/ g de pluma (Ifelebuegu & Chinonyere 2016).

En comparación a los biomateriales obtenidos mediante sulfitolisis presentó mejor desempeño que el material E1 (5 g de crudo/ g de esponja) pero menor que E2 (21,22 g de crudo/ g esponja). Estos datos no son totalmente comparables ya que la geometría y relación de masa usada en los experimentos fue diferente.

Para complementar estos análisis se realizaron estudios cinéticos de sorción/retención y ciclos de uso de los biosorbentes para ambos casos (a y b).

4.6.4.1 Estudios cinéticos

Con el objetivo de investigar los mecanismos de sorción, diferentes fragmentos del biosorbente se pusieron en contacto con diferentes medios:

- a) Crudo: los discos de esponjas se depositaron en la superficie del crudo (20 mL) sin agitación por 5 min.
- b) dispersión crudo/agua: los discos de esponjas se depositaron en la superficie de la mezcla y se agitaron a 125 rpm a temperatura ambiente por 5 min.

A diferentes tiempos para un rango de 0 a 180 min se fueron evaluando la C.S.C y C.R.C. Los resultados obtenidos fueron modelados con cinéticas de pseudo primer y segundo orden.

Capítulo IV. Biomateriales porosos de queratina a partir de la biomasa de plumas de pollo

El modelo pseudo-primer orden es ampliamente aplicado en la descripción de procesos de sorción, permite explicar los mecanismos que se presentan entre sistemas sólido/liquido (Lagergren, 1898). La ecuación usada para explicar la cinética es:

$$\frac{dq_t}{dt} = k_1(q_e - q_t) \quad (\text{Ec. 4.8})$$

Al integrar la Ec. 4.8 para las condiciones $t= 0$ a $t= t$ y $q_t= 0$ a $q_t=q_t$, se obtiene la Ec. 4.9:

$$q_t = q_e(1 - e^{-k_1 t}) \quad (\text{Ec. 4.9})$$

donde, q_t es la cantidad de crudo sorbido (g/g) a tiempo t ; q_e es la cantidad de crudo sorbido en el equilibrio; k_1 es la constante de velocidad (min^{-1}).

El modelo pseudo-segundo orden se representa por la siguiente ecuación diferencial:

$$\frac{dq_t}{dt} = k_2(q_e - q_t)^2 \quad (\text{Ec. 4.10})$$

Al integrar la Ec. 4.10 y ordenar los términos se obtiene la Ec. 4.11:

$$q_t = k_2 q_e^2 t / (1 + k_2 q_e t) \quad (\text{Ec. 4.11})$$

donde, q_t es la cantidad de crudo sorbido (g/g) a tiempo t ; q_e es la cantidad de crudo sorbido en el equilibrio; k_2 es la constante de velocidad (min^{-1}).

En la figura 4.25 se presentan los datos experimentales de sorción para los dos casos de estudio y las regresiones de los modelos de primer y segundo orden; los resultados mostraron que el proceso de sorción de crudo fue más rápido en los primeros tiempos evaluados, disminuyendo a medida que se acercaba al equilibrio, que para ambos sistemas se alcanzó a los 15 minutos de sorción. Este comportamiento se explica por la alta presencia de sitios disponibles para

Capítulo IV. Biomateriales porosos de queratina a partir de la biomasa de plumas de pollo

la sorción en el biosorbente en el inicio haciendo que el proceso de sorción sea rápido; a medida que pasa el tiempo se dispondrá de menos sitios libres para continuar con la sorción, disminuyendo la velocidad del proceso. Otro factor que contribuye a la ralentización de la sorción es la posible repulsión entre moléculas cercanas de crudo. Al analizar los datos experimentales se identificó que los valores máximos de CSC y CRC fueron de 16,9 g crudo/ g esponja y 80,1 % para el sistema de crudo a un tiempo de 15 minutos. A ese mismo tiempo en el sistema b) agua/crudo los valores medidos fueron 15,9 g crudo/ g esponja y 79,9 %.

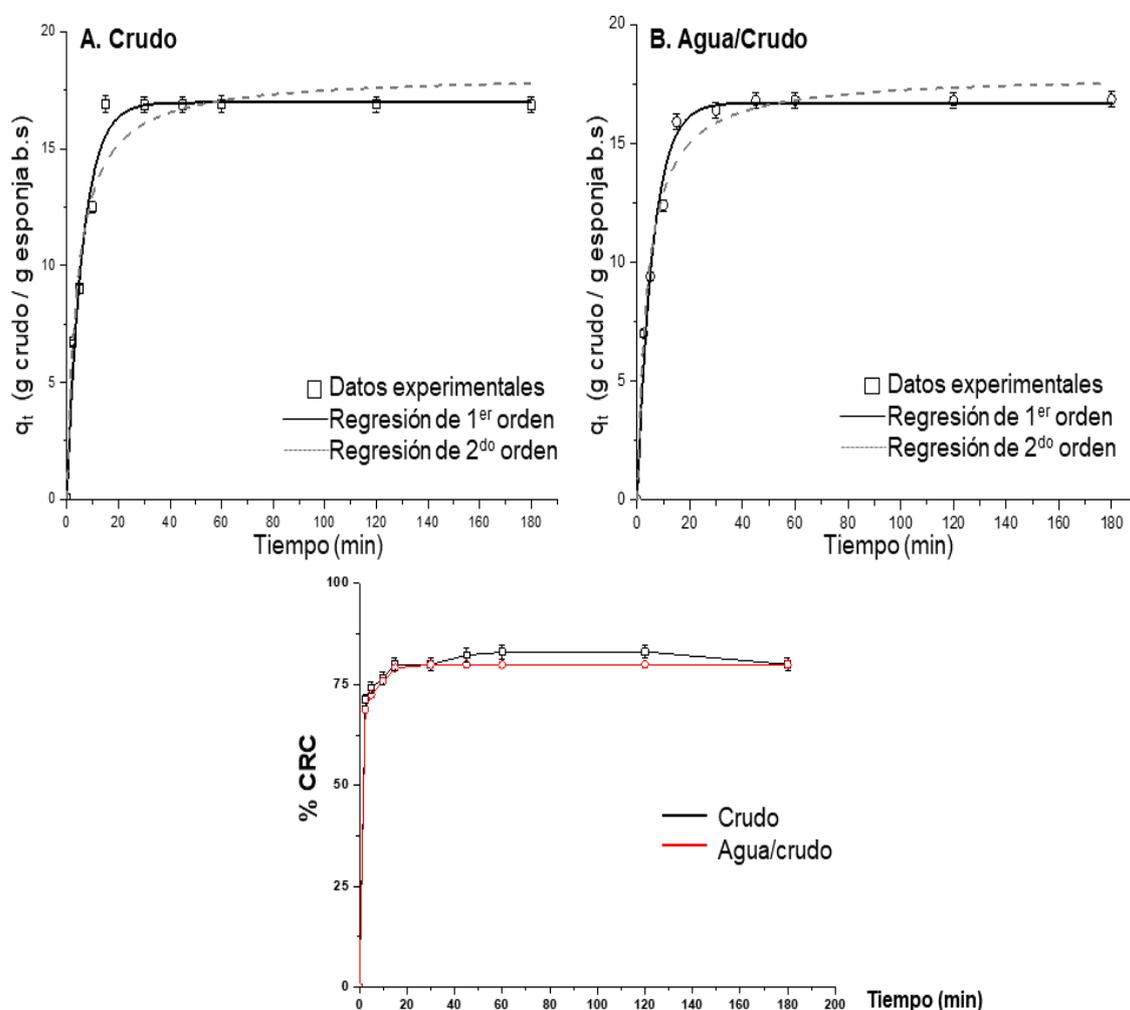


Figura 4.25 Cinéticas de sorción de crudo y regresiones de los modelos de primer y segundo orden para los casos: a) Crudo y b) Agua/crudo. c) Evolución del porcentaje de retención en el tiempo.

Capítulo IV. Biomateriales porosos de queratina a partir de la biomasa de plumas de pollo

Se determinaron los parámetros de la cinética de sorción mediante las regresiones lineales de primer orden y segundo orden (Tabla 4.13). El modelo de primer orden se ajustó mejor a los datos de sorción experimentales para ambos casos (a y b); los valores de q_e y k_1 calculados con el modelo pseudo-primer orden para crudo ($q_e= 16,99$ g crudo/ g esponja; $k_1= 0,164$) y para la mezcla agua/crudo ($q_e= 16,71$ g crudo/ g esponja; $k_1= 0,169$) no presentan diferencias significativas ($p>0,05$); los tiempos estimados de equilibrio (t_{eq}) fueron 70 y 72 minutos, respectivamente.

Kelle & Eboatu, (2018) estudiaron la capacidad de sorción de diferentes derivados de hidrocarburos para las plumas de pollo y su cinética, como resultados reportaron que esta biomasa presenta una q_e de 13,10 g crudo/g pluma a los 60 minutos de sorción.

Tabla 4.13 Parámetros cinéticos para los modelos de primer y segundo orden aplicados al proceso de sorción de crudo por esponjas de queratina.

Modelo	Parámetros	Crudo	Agua/crudo
Pseudo-primer orden $q_t = q_e(1 - e^{-kt})$	q_e	16,969 (0,33)	16,71 (0,27)
	K_1	0,164 (0,014)	0,169 (0,013)
	R^2	0,982	0,987
Pseudo-segundo orden $q_t = k_2 q_e^2 t / (1 + k_2 q_e t)$	q_e	18,17 (0,63)	17,90 (0,43)
	k_2	0,014 (0,003)	0,0146 (0,002)
	R^2	0,973	0,964

Peng y col. (2013), aplicaron un biosorbente a base de caña de maíz en el tratamiento de crudo, sus estudios cinéticos indicaron que el sistema alcanzó el equilibrio después de 60 minutos de contacto, con una capacidad de sorción experimental máxima de 24,98 g/g.

Lazzari y col., (2019) estudiaron la cinética de adsorción de crudo por criogeles de celulosa. Estos autores destacaron que el modelo que mejor se ajustó a sus datos de sorción fue el de segundo orden.

4.6.4.2 Eficiencia de reutilización de las esponjas

La eficiencia de la reutilización del material sorbente se determinó por la capacidad de sorción de crudo después de ciclos repetidos de sorción/retención en medio mixto agua/crudo (Figura 4.26).

Se logró identificar que estos discos de esponjas pueden reutilizarse en la sorción de crudo varios ciclos sin perder su estructura ni capacidad de sorción y retención; estas propiedades disminuyen significativamente en el ciclo 5, sin embargo, al no perder su estructura podrían seguir aplicándose con un menor desempeño de sorción.

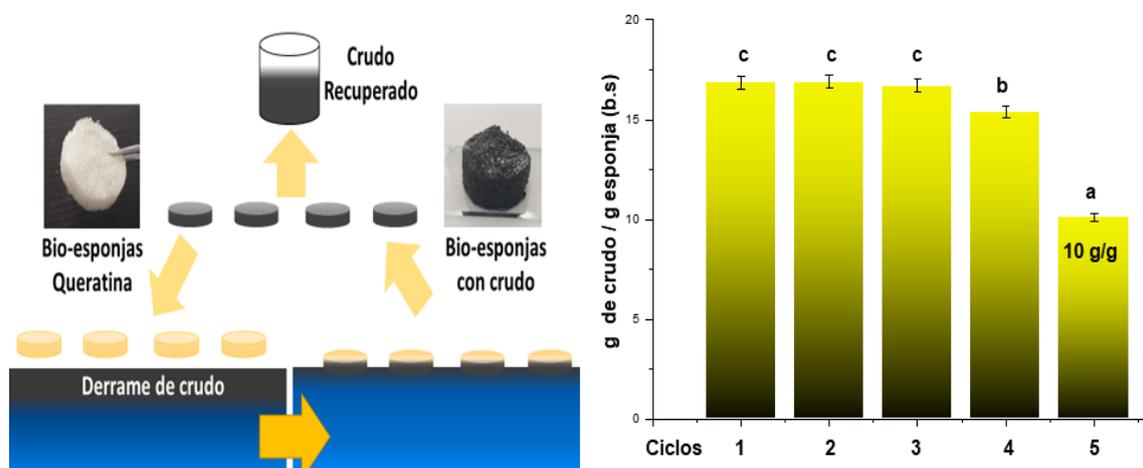


Figura 4.26. A) Esquema de sorción/retención de las esponjas de queratina. B) Variación de la capacidad de sorción de crudo en los diferentes ciclos de uso.

4.7 Conclusiones del capítulo

- Se obtuvieron materiales porosos denominados esponjas de queratina obtenidas a partir de las plumas de pollo, biomasa residuo de la industria avícola. Para su obtención se aplicaron diferentes metodologías de solubilización de las plumas de pollo que comprenden el empleo de agentes químicos como Bisulfito de Sodio, SDS y Urea, L-cisteína; los mismos son menos contaminantes y agresivos para el operador que los agentes reductores tradicionalmente usados para la obtención de la queratina, tales como el 2-mercaptoetanol o ditioneitol (DTT $C_4H_{10}O_2S_2$).
- En el caso de las dos primeras metodologías por sulfitolisis se incluyó una etapa de diálisis y secado por liofilización que permiten la formación mediante autoensamblado 3D de la queratina que conduce a la formación de las matrices porosas.
- La implementación de una metodología de extracción con mezclas de L-cisteína/urea, reemplazando la etapa de diálisis por una fase de lavados/centrifugados consecutivos, permitió la formación de esponjas compactas, blancas e inodoras, siendo una propuesta tecnológica factible para el escalado y más económica, además de no generar efluentes tóxicos.
- En cada metodología se lograron definir las condiciones de procesamiento que permiten obtener estos materiales con mejor estructura y rendimiento, debido al aumento de la queratina solubilizada y a la mejor formación de la red proteica.
- Los biomateriales porosos obtenidos se caracterizan por ser poco solubles en agua a $pH < 9$ y presentar una alta estabilidad.

Capítulo IV. Biomateriales porosos de queratina a partir de la biomasa de plumas de pollo

- El análisis de las propiedades de sorción evidenció que las isoterms de los 3 tipos de esponjas siguieron el modelo sigmoïdal característico de los materiales a base de queratina e indican que el agua sería absorbida en multicapas. Para los diferentes biomateriales obtenidos se concluye que el modelo que mejor ajustó los datos experimentales fue el de GAB.
- El análisis estructural por FTIR-ATR confirmó la presencia de las señales características presentes en la queratina, indicando que conserva los principales grupos funcionales. Se lograron identificar los cambios generados por los tratamientos químicos, mediante la presencia de los grupos SH y S-sulfo (sal de Bunte).
- Mediante el análisis de la Amida I se identificaron las estructuras secundarias presentes en las esponjas y fue posible determinar la proporción de cada estructura en los dos tipos de esponjas estudiadas, encontrando como característica principal una alta proporción de estructuras del tipo β probablemente debido a un mayor contenido de raquis en las plumas de partida.
- Todos los biomateriales obtenidos presentaron un excelente desempeño como sorbentes competitivos en la contención y manejo de derrames de crudo, con buenas capacidades de sorción y retención, siendo una opción para la revalorización de la biomasa de plumas y una alternativa para el control de derrames de crudo que generan un importante daño socio-ambiental.
- En el estudio de la cinética de sorción de las esponjas obtenidas a partir de la solubilización de plumas de pollo mediante reducción con L-cisteína/Urea, se midió la capacidad de sorción del crudo puro y mixto

Capítulo IV. Biomateriales porosos de queratina a partir de la biomasa de plumas de pollo

(agua/crudo) en función del tiempo; se observó que para la geometría y dimensiones testeadas, el equilibrio del sistema se alcanzó a los 15 minutos de proceso, alcanzando la saturación de la esponja y definiendo el tiempo de contacto mínimo; estas cinéticas fueron descritas adecuadamente a través del modelo de pseudo-primer orden.

CAPITULO V

CONCLUSIONES FINALES



5. Conclusiones finales

A lo largo de este trabajo de tesis, se ha explorado la posibilidad de aprovechar la biomasa de plumas principal residuo de la industria avícola como fuente de la proteína queratina para la generación de nuevos biomateriales sostenibles con aplicaciones ambientales. En el ámbito de la revalorización de residuos, particularmente en el enfoque hacia el manejo de la biomasa de plumas, este estudio ha logrado arrojar resultados prometedores sobre metodologías de la solubilización y transformación de dicho residuo en biomateriales con valor agregado.

Con este fin, se analizaron diversas metodologías de solubilización de la biomasa de plumas, destacando la problemática del uso del 2-mercaptoetanol por ser un reactivo tóxico y contaminante y proponiendo su reemplazo por técnicas más amigables con el medio ambiente. Las metodologías de solubilización por reducción e hidrólisis, en particular las denominadas como H1 (hidrolisis alcalina con NaOH [5 %m/v], 60 °C y 1 h) y Red 1 (reducción con Na₂S [0,1M], 60 °C y 1 h) demostraron ser alternativas prometedoras, presentando un alto rendimiento de solubilización (%Pluma_{sol} > 83 %) y contenido de proteína soluble del 0,273 g/g de pluma (Red 1) y 0,633 g/g de pluma (H1), lo que abre nuevas vías para el reemplazo de métodos convencionales menos sostenibles.

Estos derivados de queratina soluble contienen residuos de cisteína que se pueden volver a oxidar rápidamente tras la etapa de diálisis, debido a la disminución de los agentes reductores; para minimizar este efecto se estudió la modificación química de la proteína. La aplicación de la modificación por carboximetilación ácido monocloroacético (MCA al 0,2 y 0,5 %m/v) se presentó como una estrategia efectiva para potenciar la modificación del grupo -SH libre

y evitando la reformación de enlaces disulfuro (-S-S-), ofreciendo nuevas posibilidades de funcionalización de los biomateriales derivados de queratina.

Se caracterizaron el comportamiento térmico de los diferentes derivados de queratina y de las plumas de pollo mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). Se identificó que las fracciones que constituyen las plumas de pollo presentan diferentes temperaturas y entalpías de desnaturalización, debido a diferencias en el ordenamiento molecular y empaquetamiento de la estructura de la queratina, lo que corrobora que el comportamiento térmico puede variar según la biomasa de partida y la relación de las fracciones Barbas/Calamus/Raquis. En el caso de los derivados de queratina con y sin modificación, se logró identificar que tienen alta resistencia térmica con temperaturas de desnaturalización entre 150 y 250 °C. Asimismo, se analizó la estructura por FTIR confirmó la presencia de los picos característicos (Amida A, I, II, III) asociados a la fracción de α -hélice y hoja β -plana de la molécula de queratina en los diferentes productos en polvo obtenidos mediante reducciones o hidrólisis, con y sin etapa de modificación. Esta información sobre la composición de los derivados de queratina obtenidos, proporcionando una comprensión más profunda de su estabilidad y propiedades moleculares.

Con el propósito de continuar mejorando y optimizando los procesos de solubilización de plumas de pollo, se evaluó el reemplazo de la etapa de diálisis por fases de lavado/precipitado; esta propuesta se fundamenta en la necesidad de disminuir los costos de producción y facilitar el escalado industrial del proceso. Las metodologías modificadas (sin diálisis) por reducción con Na_2S e hidrólisis con NaOH permitieron la correcta obtención de los derivados de queratina. Se

destaca que estos productos tendrían posibles aplicaciones ambientales, no siendo necesaria una purificación exhaustiva de la proteína.

En la segunda parte del Trabajo de Tesis, se abordó el diseño y desarrollo de biomateriales a partir de la queratina presente en la biomasa de plumas de pollo. La generación de diferentes tipos de esponjas de queratina se posiciona como un logro destacado en este trabajo de tesis. Las diferentes metodologías de solubilización, propuestas se enfocaron en emplear agentes desnaturalizantes como Bisulfito de Sodio, SDS y Urea, L-cisteína; éstos resultan menos contaminantes y agresivos para el operador que los agentes reductores tradicionalmente usados para la obtención de la queratina, tales como el 2-mercaptoetanol o ditiotreitól. En el caso de las metodologías por sulfitólisis se incluyó una etapa de diálisis y secado por liofilización permitiendo la formación de esponjas mediante el autoensamblado 3D de la queratina.

Continuando con el objetivo de proponer metodologías viables y transferibles a nivel industrial se propuso la implementación de la extracción de queratina por reducción con el aminoácido L-cisteína en conjunto con urea en medio básico; se reemplazó la etapa de diálisis por una fase de lavados/centrifugados consecutivos seguida del secado por liofilización. Esta metodología permitió la formación de esponjas autoportantes compactas, blancas e inodoras, de mayor resistencia mecánica y alta estabilidad térmica, siendo una propuesta tecnológica factible para el escalado y más económica, además de no generar efluentes tóxicos.

Finalmente, se evaluó la aplicación ambiental de los biomateriales obtenidos; se enfocó el estudio en su utilización como materiales sorbentes para el control de derrames de aceite y/o crudo. Las diferentes esponjas de queratina

desarrolladas en este trabajo de tesis presentan un excelente desempeño como sorbentes competitivos en la contención y manejo de derrames de crudo, con buenas capacidades de sorción y retención, siendo una opción para la revalorización de la biomasa de plumas y una alternativa para el control de derrames de crudo que generan un importante daño socio-ambiental.

Se destaca el biomaterial generado mediante reducción con L-cisteína/Urea sin diálisis, su formato de discos rígidos mostró resistencia a través de distintos ciclos de captación y retención de crudo. Para este material se estudió la cinética de sorción de crudo identificando para la geometría ensayada el tiempo de contacto que permitía alcanzar la condición de equilibrio, donde el material se saturaba por el crudo absorbido; estas cinéticas fueron descritas adecuadamente a través del modelo de pseudo-primer orden.

El trabajo de tesis desarrollado contribuye a la valorización de la biomasa de plumas de pollo, transformando un subproducto en biomateriales prometedores con aplicaciones ambientales con un enfoque hacia la sostenibilidad y la economía circular, contribuyendo directa e indirectamente a la mitigación de la contaminación de diferentes sectores industriales, a la vez que se fortalece la cadena productiva del sector avícola. La exploración de diversas metodologías de solubilización, modificación química y formación de esponjas aquí descritas ha sentado las bases para futuras aplicaciones en diversos campos, desde la industria de la salud, farmacéutica, alimentaria, agroindustrial hasta la gestión ambiental.

REFERENCIAS

A

- AOAC (2010). In Helrich, K. (ed.) Official methods of analysis. Virginia: Association of Official Analytical Chemists.
- Aboushwareb, T., Eberli, D., Ward, C., Broda, C., Holcomb, J., Atala, A., & Van Dyke, M. (2009). A keratin biomaterial gel hemostat derived from human hair: evaluation in a rabbit model of lethal liver injury. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 90(1), 45-54. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31251>
- Acebo-González, D., & Hernández-García, A. T. (2013). Los métodos Turbidimétricos y sus aplicaciones en las ciencias de la vida. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 44(1). <https://www.redalyc.org/pdf/1812/181226886003.pdf>
- Ahmad, A.L., Sumathi, S., Hameed, B.H., 2005. Adsorption of residue oil from palm oil mill effluent using powder and flake chitosan: Equilibrium and kinetic studies. *Water Res.* 39, 2483–2494.
- Akahane, K., Murozono, S., & Murayama, K. (1977). Soluble Proteins from Fowl Feather Keratin: I. Fractionation and Properties. *The Journal of Biochemistry*, 81(1), 11-18.
- Akhtar, W. & Edwards, H.G.M. (1997). Fourier-transform Raman spectroscopy of mammalian and avian keratotic biopolymers. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 53(1), 81-90. [https://doi.org/10.1016/S1386-1425\(97\)83011-9](https://doi.org/10.1016/S1386-1425(97)83011-9)
- Al-Muhtaseb, A. H., McMinn, W. A. M., & Magee, T. R. A. (2002). Moisture sorption isotherm characteristics of food products: a review. *Food and Bioproducts Processing*, 80(2), 118-128. <https://doi.org/10.1205/09603080252938753>
- Arai, K. M., Takahashi, R., Yokote, Y., & Akahane, K. (1983). Amino-acid sequence of feather keratin from fowl. *European Journal of Biochemistry*, 132(3), 501-507.

B

- Baker, M. J., Trevisan, J., Bassan, P., Bhargava, R., Butler, H. J., Dorling, K. M., ... & Martin, F. L. (2014). Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. *Nature protocols*, 9(8), 1771-1791. <https://www.nature.com/articles/nprot.2014.110>
- Balaji, S., Kumar, R., Sripriya, R., Rao, U., Mandal, A., Kakkar, P., Reddy, N., & Sehgal, P. K. (2012). Characterization of keratin–collagen 3D scaffold for biomedical applications. *Polymers for Advanced Technologies*, 23(3), 500-507. <https://doi.org/10.1002/pat.1905>
- Balakumar S, Mahesh N, Arunkumar M, Sivakumar R, Hemambujavalli V (2013) Optimization of keratinase production by keratinolytic organisms under submerged fermentation. *Optimization* 5(3):1294–1300
- Barati D, Kader S, Pajoum Shariati SR et al (2017) Synthesis and characterization of photo-crosslinkable keratin hydrogels for stem cell encapsulation. *Biomacromolecules* 18:398–412
- Barbosa-Canovas, G. V., & Vega-Mercado, H. (2000). Deshidratación de alimentos. Editorial ACRIBIA SA. *Zaragoza, España*.
- Barton, P. M. J. (2011). A forensic investigation of single human hair fibres using FTIR-ATR spectroscopy and chemometrics (Doctoral dissertation, Queensland University of Technology).
- Beldarraín, A. (2001). Application of differential scanning calorimetry to protein stability studies. *Biotechnologia Aplicada*, 18(1), 10-16. <http://elfosscientiae.cigb.edu.cu/Archivo.asp?ld=6>
- Belarmino, D. D., Ladchumananandasivam, R., Belarmino, L. D., Pimentel, J. R. D. M., da Rocha, B. G., Galv, A. O., & de Andrade, S. M. (2012). Physical and morphological structure of chicken feathers (keratin biofiber) in natural, chemically and thermally modified forms. <http://dx.doi.org/10.4236/msa.2012.312129>
- Bolsa de Comercio de Rosario (2018). Informativo semanal AÑO XXXVI - N° Edición 1887 <https://www.bcr.com.ar/es/mercados/investigacion-y-desarrollo/informativo-semanal/noticias-informativo-semanal/argentina-9>

- Borja.Fernández-d'Arlas, "Improved aqueous solubility and stability of wool and feather proteins by reactive-extraction with H₂O₂ as bisulfide (SS) splitting agent." *European Polymer Journal* 103 (2018): 187-197. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.04.010>
- Burnett LR, Rahmany MB, Richter JR, Aboushwareb TA, Eberli D, Ward CL, Orlando G, Hantgan RR, Van Dyke ME (2013) Hemostatic properties and the role of cell receptor recognition in human hair keratin protein hydrogels. *Biomaterials* 34(11):2632–2640
- Byler, D. M., & Susi, H. (1986). Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 25(3), 469-487. <https://doi.org/10.1002/bip.360250307>

C

- Cardamone, J. M. (2010). Investigating the microstructure of keratin extracted from wool: Peptide sequence (MALDI-TOF/TOF) and protein conformation (FTIR). *Journal of Molecular Structure*, 969(1-3), 97-105. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2010.01.048>
- Cardamone, J. M., Tunick, M. H., & Onwulata, C. (2013). Keratin sponge/hydrogel: I. Fabrication and characterization. *Textile Research Journal*, 83(7), 661-670. <https://doi.org/10.1177/0040517512468814>
- Chen PY, McKittrick J, Meyers MA (2012) Biological materials: functional adaptations and bioinspired designs. *Prog Mater Sci* 57:1492–1704. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2012.03.001>
- Coates, J. (2006). Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- Cortez, P. M. M. (2020). La espectroscopia FTIR-ATR aplicada al análisis de alimentos y bebidas. En Cortez, P. M. M (Ed.), *Principios y aplicaciones de la espectroscopia de infrarrojo en el análisis de alimentos y bebidas*. (pp. 83-99). CIATEJ. https://ciatej.mx/files/divulgacion/divulgacion_5f89fd7801268.pdf
- Coward-Kelly G, Agbogbo FK, Holtzaple MT (2006) Lime treatment of keratinous materials for the generation of highly digestible animal feed: 2. Animal hair. *Bioresour Technol* 97(11):1344–1352

- Curcio, Manuela, et al. "Hydrophobically modified keratin vesicles for GSH-responsive intracellular drug release." *Bioconjugate chemistry* 26.9 (2015): 1900-1907. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00289>

D

- Dalev P, Ljubomirova A, Simeonova L, Ivanov I (1996) Protein hydrolysates from waste feathers for feed and their enrichment with lysine through enzyme catalyzed covalent binding. In: *Mededelingen-faculteit landbouwkundige en toegepaste biologische wetenschappen*, vol 61, pp 1641–1644
- Dalev P, Ivanov I, Liubomirova A (1997) Enzymic modification of feather keratin hydrolysates with lysine aimed at increasing the biological value. *J Sci Food Agric* 73(2):242–244
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. *InfoStat versión 2020*. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>

E

- Earland C, Knight C (1956) Studies on the structure of keratin II. The amino acid content of fractions isolated from oxidized wool. *Biochimica et Biophysica Acta* 22(3):405–411
- Esparza, Y. O. (2017). *Fabrication of feather keratin bio-based materials: Thermoplastics and tissue engineered scaffolds* [Tesis doctoral, Universidad de Alberta, Canadá]. <https://doi.org/10.7939/R39W09C65>

F

- FAO (2023). *Producción y productos avícolas*. [Acceso Marzo, 2023] <https://www.fao.org/poultry-production-products/production/es/>
- Fan, X. (2008). *Value-added products from chicken feather fiber and protein*. Tesis Doctoral. Auburn University. <https://www.proquest.com/openview/7acfa9b01b0fe6112526e612db08736d/1?pq-origsite=gscholar&cbl=18750>
- Fennema, Owen R. *Food chemistry*. Vol. 76. CRC Press, 1996.

- Flores-Hernández CG, Colín-Cruz A, Velasco-Santos C, Castaño VM, Rivera-Armenta JL, Almendarez-Camarillo A, García-Casillas PE, Martínez-Hernández AL (2014). All green composites from fully renewable biopolymers: chitosan-starch reinforced with keratin from feathers. *Polymers* 6(3):686–705
- Fraser R, Macrae T, Parry D, Suzuki E (1971). The structure of feather keratin. *Polymer* 12(1):35–56. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(71\)90011-5](https://doi.org/10.1016/0032-3861(71)90011-5)

G

- Gacén Guillén, J. (1969). Aspectos químicos del blanqueo de la lana con peróxido de hidrógeno: Modificación química de la queratina. *Boletín del Instituto de Investigación Textil y de Cooperación Industrial*, 1969, nº 39, p. 43-70. <http://hdl.handle.net/2099/5909>
- Grazziotin, A., Pimentel, F.A., De Jong, E.V., Brandelli, A. (2006). Nutritional improvement of feather protein by treatment with microbial keratinase. *Anim. Feed Sci. Technol.* 1261, 135–144
- Grewther WG, Fraser RDB, Lennox FG, York N, Neurath H, Press A, York N, Jones CB, Mecham DK (1970) Alkali solubilization of chicken feather keratin. *Agric Biol Chem* 34:16–22
- Gupta A (2014) Human hair “Waste” and its utilization: gaps and possibilities. *J Waste Manag* 2014:1–17. <https://doi.org/10.1155/2014/498018>
- Gupta A, Perumal R, Yunus RBM, Kamarudin NB (2012). Extraction of keratin protein from chicken feather. In: *Chemeca 2011: engineering a better world*, pp 1–10.
- Gurav RG, Jadhav JP (2013). A novel source of biofertilizer from feather biomass for banana cultivation. *Environ Sci Pollut R* 20(7):4532–4539. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1405-z>
- Gousterova A, Nustorova M, Goshev I, Christov P, Braikova D, Tishinov K, Haertle T, Nedkov P (2003). Alkaline hydrolysate of waste sheep wool aimed as fertilizer. *Biotechnol Biotechnol Equip* 17:140–145. <https://doi.org/10.1080/13102818.2003.10817072>

H

- Hadas A, Kautsky L (1994) Feather meal, a semi-slow-release nitrogen fertilizer for organic farming. *Fertil Res* 38(2):165–170. <https://doi.org/10.1007/BF00748776>
- Hill, P., Brantley, H., & Van Dyke, M. (2010). Some properties of keratin biomaterials: kerateines. *Biomaterials*, 31(4), 585-593. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.076>
- Huda S, Yang YQ (2008) Composites from ground chicken quill and polypropylene. *Compos Sci Technol* 68(3–4):790–798. <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2007.08.015>
- Huda S, Yang YQ (2009) Feather fiber reinforced light-weight composites with good acoustic properties. *J Polym Environ* 17(2):131–142. <https://doi.org/10.1007/s10924-009-0130-2>
- Hussain, F. S., Memon, N., Khatri, Z., & Memon, S. (2020). Solid waste-derived biodegradable keratin sponges for removal of chromium: A circular approach for waste management in leather industry. *Environmental Technology & Innovation*, 20, 101120. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101120>

I

- Ifelebuegu, A., & Momoh, Z. (2015). An Evaluation of the Adsorptive Properties of Coconut Husk for Oil Spill Cleanup. In *International Conference on Advances in Applied Science and Environmental Technology* (pp. 33-37). IRED. <https://doi.org/10.15224/978-1-63248-040-8-38>
- Ifelebuegu, A. O., & Johnson, A. (2017). Nonconventional low-cost cellulose- and keratin-based biopolymeric sorbents for oil/water separation and spill cleanup: A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 47(11), 964-1001. <https://doi.org/10.1080/10643389.2017.1318620>
- Isarankura Na Ayutthaya, S., Tanpichai, S., & Wootthikanokkhan, J. (2015). Keratin extracted from chicken feather waste: extraction, preparation, and structural characterization of the keratin and keratin/biopolymer films and electrospuns. *Journal of Polymers and the Environment*, 23(4), 506-516. <https://doi.org/10.1007/s10924-015-0725-8>

- IEA (2020). INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. World energy outlook 2020 Cozzi, L., Gould, T., Bouckart, S., Crow, D., Kim, T. Y., Mcglade, C., ... & Wetzel, D. (2020. International Energy Agency: Paris, France, 1-461.

J

- Jin E, Reddy N, Zhu Z, Yang Y (2011) Graft polymerization of native chicken feathers for thermoplastic applications. *J Agr Food Chem* 59(5):1729–1738

K

- Karan, C. P., Rengasamy, R. S., and Das, D. (2011). Oil spill cleanup by structured fibre assembly. *Indian Journal of Fibre & Textile Research*, 36(2), 190-200.
<http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/11898/1/IJFTR%2036%282%29%20190-200.pdf>
- Karthikeyan R, Balaji S, Sehgal P (2007) Industrial applications of keratins—a review. *J Sci Ind Res* 66(9):710
- Katoh K, Tanabe T, Yamauchi K (2004) Novel approach to fabricate keratin sponge scaffolds with controlled pore size and porosity. *Biomaterials*, 25, 425-4262. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.11.018>
- Kelle, H. I., & Eboatu, A. N. (2018). Determination of the viability of chicken feather as oil spill clean-up sorbent for crude oil and its lower fractions. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 22(2), 267-273.
- Kock, J. W. (2006). Physical and mechanical properties of chicken feather materials. Tesis de master en Master of Science in the School of Civil and Environmental Engineering
- Kornilowicz-Kowalska T, Bohacz J (2010) Dynamics of growth and succession of bacterial and fungal communities during composting of feather waste. *Bioresour Technol* 101(4):1268–1276.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.053>
- Khosa, M. A., Wu, J., & Ullah, A. (2013). Chemical modification, characterization, and application of chicken feathers as novel biosorbents. *Rsc Advances*, 3(43), 20800-20810. <https://doi.org/10.1039/C3RA43787F>

- Kumar SL, Anandhavelu S, Sivaraman J, Swathy M (2017) Modified extraction and characterization of keratin from Indian goat hoof: a biocompatible biomaterial for tissue regenerative applications. *Integr Ferroelectr* 184(1):41–49
- Kumaran, P. H., Gupta, A., & Sharma, S. (2017). Synthesis of wound-healing keratin hydrogels using chicken feathers proteins and its properties. *Int J Pharm Pharm Sci*, 9(2), 171-8. <https://pdfs.semanticscholar.org/e09f/fb47898c3ed3174f1e170fde3c4cca8acd96.pdf>
- Kumawat, T. K., Sharma, A., Sharma, V., & Chandra, S. (2018). Keratin waste: the biodegradable polymers. In *Keratin*. IntechOpen.
- Kornilowicz-Kowalska Teresa, B. J. (2011). "Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects." *Waste Management* 31: 1689-1701.

L

- Lagergren, S.K., 1898. About the theory of so-called adsorption of soluble substances. *Sven. Vetenskapsakad. Handlingar* 24, 1–39.
- Lazzari, L. K., Zampieri, V. B., Neves, R. M., Zanini, M., Zattera, A. J., & Baldasso, C. (2019). A study on adsorption isotherm and kinetics of petroleum by cellulose cryogels. *Cellulose*, 26, 1231-1246.
- Lee YS, Phang L-Y, Ahmad SA, Ooi PT (2016) Microwave-Alkali treatment of chicken feathers for protein hydrolysate production. *Waste Biomass Valorization* 7:1147–1157. <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9483-7>
- Lodén M (2009) Hydrating substances. In: Barel AO, Paye M, Maibach HI (eds) vol 36, 3rd edn. Informa Healthcare, New York, pp 107–119. <https://doi.org/10.1111/j.1524-4725.2009.01444.x>
- Lomauro, C. J., Bakshi, A. S., & Labuza, T. P. (1985). Evaluation of food moisture sorption isotherm equations part I: Fruit, vegetable and meat products. *LWT - Food Science and Technology*, 18(2), 111-117.

M

- Ma B, Qiao X, Hou X, Yang Y (2016) Pure keratin membrane and fibers from chicken feather. *Int J Biol Macromol* 89:614–621. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.039>
- Madaghiele, M., Demitri, C., Sannino, A., & Ambrosio, L. (2014). Polymeric hydrogels for burn wound care: Advanced skin wound dressings and regenerative templates. *Burns & Trauma*, 2(4), 2321-3868. <https://doi.org/10.4103/2321-3868.143616>
- Ministerio de Agricultura, ganadería y pesca de Argentina [MAGyP], (2020). Anuario avícola 2020 – Año XXV N° 83. [MAGyP]. https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/aves/informes/boletines/archivos/000001_Anuario%20Avicola%202020.pdf
- MAGyP (2021). ANUARIO AVICOLA 2021 – Año XXVI N° 84. Ministerio de Agricultura, ganadería y pesca, [Acceso: Marzo 2023] https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/aves/informes/boletines/archivos/000001_Anuario%20Avicola%202021.pdf
- Escenarios estratégicos 2030. Ministerio de Energía y Minería. <http://www.energia.gob.ar/contenidos/archivos/Reorganizacion/planeamiento/escenarios/as15160516401.pdf>
- Manivasagan P, Sivakumar K, Gnanam S, Venkatesan J, Kim S-K (2014) Production, biochemical characterization and detergents application of keratinase from the marine actinobacterium *Actinoalloteichus* sp. MA-32. *J Surfactants Deterg* 17 (4):669–682
- Malafaya, P. B., Silva, G. A., & Reis, R. L. (2007). Natural–origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Advanced drug delivery reviews*, 59(4-5), 207-233. <https://doi.org/10.4103/2321-3868.143616>
- Martínez-Hernández, A.L.; Velsco-Santos de Icaza, M. y Castaño, V.M. (2005). Microstructural characterisation of keratin fibres from chicken feathers. *International Journal of Environment and Pollution*, 23 (2), 162-177. <https://doi.org/10.1504/IJEP.2005.006858>
- Martínez-Hernández, A. L., Santiago-Valtierra, A. L...; Alvarez-Ponce, M. J. (2008). Chemical modification of keratin biofibres by graft polymerisation of methyl methacrylate using redox initiation. *Materials Research Innovations*, 12(4), 184-191. <https://doi.org/10.1179/143307508X362828>

- Martinez-Hernandez, A. L., & Velasco-Santos, C. (2012). Keratin Fibers from Chicken Feathers: Structure and Advances in Polymer Composites. In Renke Dullaart and João Mousquès (Ed.), *Keratin: Structure, Properties and Applications* (pp. 149–211).
- Martelli, S. M., Moore, G., Paes, S. S., Gandolfo, C., & Laurindo, J. B. (2006). Influence of plasticizers on the water sorption isotherms and water vapor permeability of chicken feather keratin films. *LWT-Food Science and Technology*, 39(3), 292-301. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.12.014>
- Martelli, S. M., & Laurindo, J. B. (2012). Chicken feather keratin films plasticized with polyethylene glycol. *International Journal of Polymeric Materials*, 61(1), 17-29. <https://doi.org/10.1080/00914037.2011.557809>
- Mokrejs P, Svoboda P, Hrnčirik J et al (2011) Processing poultry feathers into keratin hydrolysate through alkaline-enzymatic hydrolysis. *Waste Manag Res* 29:260–267. <https://doi.org/10.1177/0734242X10370378>
- Monteiro, V. F., Maciel, A. P., & Longo, E. (2005). Thermal analysis of caucasian human hair. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 79, 289-293. <https://doi.org/10.1007/s10973-005-0051-9>
- Mu, B., Hassan, F., & Yang, Y. (2020). Controlled assembly of secondary keratin structures for continuous and scalable production of tough fibers from chicken feathers. *Green Chemistry*, 22(5), 1726-1734. <https://doi.org/10.1039/C9GC03896E>

N

- Nagai, Y., & Nishikawa, T. (1970). Alkali Solubilization of Chicken Feather Keratin. *Agricultural and Biological Chemistry*, 34(1), 16–22
- Nakata R, Osumi Y, Miyagawa S et al (2015) Preparation of keratin and chemically modified keratin hydrogels and their evaluation as cell substrate with drug releasing ability. *J Biosci Bioeng* 120:111–116
- Nakata R, Tachibana A, Tanabe T (2014) Preparation of keratin hydrogel/hydroxyapatite composite and its evaluation as a controlled drug release carrier. *J Mater Sci Eng C* 41:59–64

- Ningthoujam, D. S., Tamreihao, K., Mukherjee, S., Khunjamayum, R., Devi, L. J., & Asem, R. S. (2018). Keratinaceous wastes and their valorization through keratinolytic microorganisms. In *Keratin*. IntechOpen.

O

- Origin (Pro), 8 version OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA. www.originlab.com

P

- Patrucco, A., Cristofaro, F., Simionati, M., Zoccola, M., Bruni, G., Fassina, L., ... & Tonin, C. (2016). Wool fibril sponges with perspective biomedical applications. *Materials Science and Engineering: C*, 61, 42-50. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.11.073>
- Peng D, Lan Z, Guo C, Yang C, Dang Z (2013) Application of 362 cellulase for the modification of corn stalk: leading to oil sorption. *Bioresour Technol* 137:414–418
- Peralta Ramos ML, Gonzalez JA, Fabian L, Perez CJ, Villanueva ME, Copello GJ (2017) Sustainable and smart keratin hydrogel with pH-sensitive swelling and enhanced mechanical properties. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 78:619–626. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.04.120>
- Poole AJ, Church JS, Huson MG (2009) Environmentally sustainable fibers from regenerated protein. *Biomacromolecules* 10(1):1–8. <https://doi.org/10.1021/bm8010648>
- Poole, A. J., Lyons, R. E., & Church, J. S. (2011). Dissolving feather keratin using sodium sulfide for bio-polymer applications. *Journal of Polymers and the Environment*, 19, 995-1004
- Poole AJ, Church JS (2015) The effects of physical and chemical treatments on Na₂S produced feather keratin films. *Int J Biol Macromol* 73:99–108

R

- Rahman MS & Sablani SS (2008). Water activity measurement methods of foods. In: Rahman MS, Editors. *Food properties handbook*. 2nd ed. CRC Press. Boca Raton, USA. p. 9-30.

- Ramírez-Paredes, F. I., Manzano-Muñoz, T., Garcia-Prieto, J. C., Bello-Estévez, J. F., Zhadan, G. G., Shnyrov, V. L., ... & Roig, M. G. (2013). Biosorption of heavy metals from acid mine drainages onto pig bristles, poultry feathers and crustacean shells industrial biowastes. *Journal of Basic & Applied Sciences*, 9, 510. <http://dx.doi.org/10.6000/1927-5129.2013.09.66>
- Roig, M.G., Ramírez, F.I. y Manzano, T. (2003). Bioadsorción de metales pesados de aguas ácidas de minas II. Sobre residuos con queratina (pelos de cerdo, pluma de ave) y quitina (caparazones de crustáceos). *INGENIERÍA QUÍMICA* 400, 184-204.
- Rouse, J. G., & Van Dyke, M. E. (2010). A review of keratin-based biomaterials for biomedical applications. *Materials*, 3(2), 999-1014. <https://doi.org/10.3390/ma3020999>
- Ramirez, D. O. S., Carletto, R. A., Tonetti, C., Giachet, F. T., Varesano, A., & Vineis, C. (2017). Wool keratin film plasticized by citric acid for food packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, 12, 100-106. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2017.04.004>
- Reddy N, Jiang QR, Jin EQ, Shi Z, Hou XL, Yang YQ (2013) Bio-thermoplastics from grafted chicken feathers for potential biomedical applications. *Colloid Surf B* 110:51–58. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.04.019>
- Reddy N, Chen L, Zhang Y, Yang Y (2014) Reducing environmental pollution of the textile industry using keratin as alternative sizing agent to poly(vinyl alcohol). *J Clean Prod* 65:561–567
- Reddy N, Yang YQ (2007) Structure and properties of chicken feather barbs as natural protein fibers. *J Polym Environ* 15(2):81–87. <https://doi.org/10.1007/s10924-007-0054-7>
- Reddy, C. C., Khilji, I. A., Gupta, A., Bhuyar, P., Mahmood, S., AL-Japairai, K. A. S., & Chua, G. K. (2021). Valorization of keratin waste biomass and its potential applications. *Journal of Water Process Engineering*, 40, 101707
- Reichl S (2009) Films based on human hair keratin as substrates for cell culture and tissue engineering. *Biomaterials* 30:6854–6866. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.08.051>

S

- Salazar Cedillo, Marcela Virginia. "Determinación del método para la obtención de queratina cosmética a partir de plumas gallináceas." (2013). Tesis de grado de Química-Farmacéutica. Carrera de Química y Farmacia Quito. UCE <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/1088>
- Sánchez-Ramirez DO, Carletto RA, Tonetti C et al (2017) Wool keratin film plasticized by citric acid for food packaging. *Food Packag Shelf Life* 12:100–106. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2017.04.004>
- Saravanan S, Sameera D, Moorthi A, Selvamurugan N (2013) Chitosan scaffolds containing chicken feather keratin nanoparticles for bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol* 62:481–486. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.09.034>
- Sehgal, P. K., Sastry, T. P., & Kumar, M. (1986). Studies on solubilised keratins from poultry feathers. *Leather Sci*, 33, 333-344.
- Syed DG, Lee JC, Li WJ, Kim CJ, Agasar D (2009) Production, characterization and application of keratinase from *Streptomyces gulbargensis*. *Biores Tech* 100(5):1868–1871. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.09.047>
- Schrooyen, P. M. M., Dijkstra, P. J., Oberthü, R. G., Bantjes, A., & Feijen, J. (2000). Partially carboxymethylated feather keratins. 1. Properties in aqueous systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 4326–4334. <https://doi.org/10.1021/jf9913155>
- Schrooyen, P.M., Dijkstra, P, Oberthur, R Bantjes, A y Feijen, J. (2001)a. Partially carboxymethylated feather keratins. 2. Thermal and mechanical properties of the films. *J. Agric. Food Chem.* 49, 221. <https://doi.org/10.1021/jf0004154>
- Schrooyen, P. M., Dijkstra, P. J., Oberthür, R. C., Bantjes, A., & Feijen, J. (2001)b. Stabilization of solutions of feather keratins by sodium dodecyl sulfate. *Journal of colloid and interface science*, 240(1), 30-39. <https://doi.org/10.1006/jcis.2001.7673>
- Schrooyen, P.M. y Oberthur, R. (2007). Keratin-based products and methods for their productions. *Nederlands, Stichting Nederlands Instituut voor*

Zuivelonderzoek. Patent No.: US 7169896 B2.
<https://patents.google.com/patent/US7169896B2/en>

- Sharma, S., y Gupta, A. (2016). Sustainable Management of Keratin Waste Biomass: Applications and Future Perspectives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 59, 1–14. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2016150684>
- Sharma, S., Gupta, A., Kumar, A., Kee, C. G., Kamyab, H., & Saufi, S. M. (2018). An efficient conversion of waste feather keratin into ecofriendly bioplastic film. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 20(10), 2157-2167. <https://doi.org/10.1007/s10098-018-1498-2>
- Schägger, H., & Von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical biochemistry*, 166(2), 368-379.
- Shavandi, A., Silva, T. H., Bekhit, A. A., y Bekhit, A. E.-D. A. (2017). Keratin: dissolution, extraction and biomedical application. *Biomaterials Science*, 5(9), 1699–1735. <https://doi.org/10.1039/C7BM00411G>
- Sinkiewicz, I., Śliwińska, A., Staroszczyk, H., & Kołodziejska, I. (2016). Alternative Methods of Preparation of Soluble Keratin from Chicken Feathers. *Waste and Biomass Valorization*, 8(4), 1043–1048.
- Song N-B, Jo W-S, Song H-Y et al (2013) Effects of plasticizers and nano-clay content on the physical properties of chicken feather protein composite films. *Food Hydrocoll* 31:340–345. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.11.024>
- Spiridon I, Paduraru OM, Rudowski M, Kozlowski M, Darie RN (2012) Assessment of changes due to accelerated weathering of low-density polyethylene/feather composites. *Ind Eng Chem Res* 51(21):7279–7286. <https://doi.org/10.1021/ie300738d>
- Srinivasan, B., Kumar, R., Shanmugam, K., Sivagnam, U., Reddy, N. P., & Sehgal, P. K. (2010). Porous Keratin Scaffold-Promising Biomaterial for Tissue Engineering and Drug Delivery. *Journal of Biomedical Materials Research*, 92(Part B), 5-12. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31483>
- Sun P, Liu Z-T, Liu Z-W (2009) Particles from bird feather: a novel application of an ionic liquid and waste resource. *J Hazard Mater* 170(2):786–790. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.05.034>
- Sundaram M, Legadevi R, Banu NA, Gayathri V, Palanisammy A (2015). A study on anti bacterial activity of keratin nanoparticles from chicken feather

waste against *Staphylococcus aureus* (Bovine Mastitis Bacteria) and its anti oxidant activity. Eur J Biotechnol Biosci 6:1–5

T

- Takahashi, K., Yamamoto, H., Yokote, Y., & Hattori, M. (2004). Thermal behavior of fowl feather keratin. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 68(9), 1875-1881. <https://doi.org/10.1271/bbb.68.1875>
- Tachibana, A., Furuta, Y., Takeshima, H., Tanabe, T., & Yamauchi, K. (2002). Fabrication of wool keratin sponge scaffolds for long-term cell cultivation. *Journal of Biotechnology*, 93(2), 165-170. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00395-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00395-9)
- Tesfaye, T., Sithole, B., Ramjugernath, D., & Chuniilall, V. (2017). Valorisation of chicken feathers: Characterisation of chemical properties. *Waste Management*, 68, 626-635. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.06.050>
- Tesfaye, T., Sithole, B., Ramjugernath, D., & Mokhothu, T. (2018). Valorisation of chicken feathers: Characterisation of thermal, mechanical and electrical properties. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 9, 27-34. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2018.05.003>
- Tissera, Nadeeka D., et al. "Fibrous keratin protein bio micro structure for efficient removal of hazardous dye waste from water: surface charge mediated interfaces for multiple adsorption desorption cycles." *Materials Chemistry and Physics* 246 (2020): 122790. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2020.122790>
- Tonin, C., Aluigi, A., Varesano, A., & Vineis, C. (2010). Keratin-based nanofibres. *Nanofibers*. InTech, 139-158. <https://doi.org/10.5772/8151>
- Torii, H.; Tasumi M.(1996) Theoretical analyses of the amide I infrared bands of globular proteins. *Infrared spectroscopy of biomolecules*, Chap. 1: 1-18, Mantsch H and Chapman D editors, Wiley-Liss Inc. K. Murayama, M. Tomida, *Biochem.* 43 (2004) 11526.
- Tsuda Y, Nomura Y (2014) Properties of alkaline-hydrolyzed waterfowl feather keratin. *Anim Sci J* 85:180–185. <https://doi.org/10.1111/asj.12093>

V

- Vasconcelos, A., & Cavaco-Paulo, A. (2013). The use of keratin in biomedical applications. *Current Drug Targets*, 14(5), 612-619. <https://doi.org/10.2174/1389450111314050010>
- Villa ALV, Aragão MRS, dos Santos EP et al (2013) Feather keratin hydrolysates obtained from microbial keratinases: effect on hair fiber. *BMC Biotechnol* 13:15. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-13-15>
- Vineis C., Varesano A., Varchi G., Aluigi A. (2019) Extraction and Characterization of Keratin from Different Biomasses. In: Sharma S., Kumar A. (eds) *Keratin as a Protein Biopolymer*. Springer Series on Polymer and Composite Materials. Springer, Cham.
- Vasileva-Tonkova E, Gousterova A, Neshev G (2009) Ecologically safe method for improved feather wastes biodegradation. *Int Biodeter Biodegr* 63(8):1008–1012. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2009.07.003>

W

- Wahi, R., Chuah, L.A., Choong, T.S.Y., Ngaini, Z., Nourouzi, M.M., 2013. Oil removal from aqueous state by natural fibrous sorbent: An overview. *Sep. Purif. Technol.* 113, 51–63.
- Wang K, Li R, Ma JH et al (2016) Extracting keratin from wool by using l-cysteine. *Green Chem* 18:476–481. <https://doi.org/10.1039/C5GC01254F>
- Wang J, Hao S, Luo T, Cheng Z, Li W, Gao F, Guo T, Gong Y, Wang B (2017) Feather keratin hydrogel for wound repair: preparation, healing effect and biocompatibility evaluation. *Colloids Surf, B* 149:341–350
- Williams, C. M. (2013). Gestión de residuos de aves de corral en los países en desarrollo. *Función de las aves de corral en la nutrición humana*, 48.
- Wojciechowska, E., Wlochowicz, A. and Weselucha-Birczynska, A. (1999) 'Application of Fourier-transform infrared and Raman spectroscopy to study the degradation of the wool fiber keratin', *J. Mol. Struct.*, Vol. 511, pp.307–318. [https://doi.org/10.1016/S0022-2860\(99\)00173-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2860(99)00173-8)

- Wojciechowska, E., Włochowicz, A., Wysocki, M., Pielesz, A., & Wesełucha-Birczyńska, A. (2002). The application of Fourier-transform infrared (FTIR) and Raman spectroscopy (FTR) to the evaluation of structural changes in wool fibre keratin after deuterium exchange and modification by the orthosilicic acid. *Journal of Molecular Structure*, 614(1-3), 355-363. [https://doi.org/10.1016/S0022-2860\(02\)00276-4](https://doi.org/10.1016/S0022-2860(02)00276-4)
- Wojciechowska, E., Rom, M., Włochowicz, A., Wysocki, M., & Wesełucha-Birczyńska, A. (2004). The use of Fourier transform-infrared (FTIR) and Raman spectroscopy (FTR) for the investigation of structural changes in wool fibre keratin after enzymatic treatment. *Journal of Molecular Structure*, 704(1-3), 315-321. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2004.03.044>
- Wolok, E., Barafi, J., Joshi, N., Girimonte, R., & Chakraborty, S. (2020). Study of bio-materials for removal of the oil spill. *Arabian Journal of Geosciences*, 13(23), 1-11. <https://doi.org/10.1007/s12517-020-06244-3>
- Wrześniewska-Tosik, K., & Adamiec, J. (2007). Biocomposites with a content of keratin from chicken feathers. *Fibres & Textiles in Eastern Europe*, 15(1), 60.

X

- Xie H, Li S, Zhang S (2005). Ionic liquids as novel solvents for the dissolution and blending of wool keratin fibers. *Green Chem* 7:606. <https://doi.org/10.1039/b502547h>
- Xu, H. y Yang Y. (2014a). Controlled De-Cross- Linking and Disentanglement of Feather Keratin for Fiber Preparation via a Novel Process. *ACS sustainable chemistry & engineering*. 2, 1404–1410. <https://doi.org/10.1021/sc400461d>
- Xu H, Cai S, Xu L, Yang Y (2014b). Water-stable three-dimensional ultrafine fibrous scaffolds from keratin for cartilage tissue engineering. *Langmuir* 30:8461–8470. <https://doi.org/10.1021/la500768b>

Y

- Yamauchi K, Yamauchi A, Kusunoki T y col. (1996). Preparation of stable aqueous solution of keratins, and physiochemical and biodegradational properties of films. *J Biomed Mater Res* 31:439–444. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199608\)](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199608))

- Yang YQ, Reddy N (2013). Potential of using plant proteins and chicken feathers for cotton warpsizing. *Cellulose* 20(4):2163–2174. <https://doi.org/10.1007/s10570-013-9956-9>
- Yin XC, Li FY, He YF, Wang Y, Wang RM (2013). Study on effective extraction of chicken feather keratins and their films for controlling drug release. *Biomater Sci-UK* 1(5):528–536. <https://doi.org/10.1039/c3bm00158j>
- Yu D, Cai JY, Liu X, Church JS, Wang L (2014) Novel immobilization of a quaternary ammonium moiety on keratin fibers for medical applications. *Int J Biol Macromol* 70:236–240

Z

- Zhan M, Wool RP (2011) Mechanical properties of chicken feather fibers. *Polym Compos* 32(6):937–944
- Zhang, J., Li, Y., Li, J., Zhao, Z., Liu, X., Li, Z., Han, Y., Hu, J., Chen, A. (2013). Isolation and characterization of biofunctional keratin particles extracted from wool wastes. *Powder Technol.* 246, 356–362 (2013)
- Zhang, X., Guo, Y., Li, W., Zhang, J., Wu, H., Mao, N., & Zhang, H. (2021). Magnetically recyclable wool keratin modified magnetite powders for efficient removal of Cu²⁺ ions from aqueous solutions. *Nanomaterials*, 11(5), 1068. <https://doi.org/10.3390/nano11051068>
- Zhou, L. T., Yang, G., Yang, X. X., Cao, Z. J., & Zhou, M. H. (2014). Preparation of regenerated keratin sponge from waste feathers by a simple method and its potential use for oil adsorption. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(8), 5730-5736. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2513-8>
- Zoccola M, Aluigi A, Tonin C (2009) Characterisation of keratin biomass from butchery and wool industry wastes. *J Mol Struct* 938(1–3):35–40. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2009.08.036>