

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Químico-Farmacêutica
Área de Tecnologia Bioquímico- Farmacêutica

Extração, caracterização e modificação química da queratina
extraída das penas de frango

Milena Nakagawa de Arruda

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Bronislaw Polakiewicz

São Paulo
2010

Milena Nakagawa de Arruda

Extração, caracterização e modificação química da queratina extraída
das penas de frango

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Bronislaw Polakiewicz
orientador/presidente

1º examinador

2º examinador

São Paulo, 30 de Janeiro de 2010.

Dedico este trabalho àqueles que são minha inspiração de todos os dias:

*Meus pais Salua Tabal Nakagawa e Roberto Nakagawa
por me proporcionarem coragem e autoconfiança
para transpor as barreiras da vida,
pelo apoio em todos os momentos e
pelo amor imensurável...*

*Meus irmãos Rodolfo Nakagawa e Erika Nakagawa
pelo constante incentivo aos estudos e
por todo o carinho
que sempre me proporcionaram..*

*Meu esposo e eterno companheiro Denis Ferreira de Arruda,
por estar ao meu lado durante todos esses anos,
pelos constantes momentos de ensino e aprendizagem,
e pelo amor de todos os dias...*

“As pessoas que vencem neste mundo são aquelas que procuram as circunstâncias de que precisam e, quando não as encontram, as criam.”

Bernard Shaw

AGRADEÇO...

À Deus por me conceder boa saúde, física e mental, mantendo-me forte nas intempéries da vida.

Ao Professor Bronislaw Polakiewicz por todos os seus ensinamentos, pela amizade sincera e pelo seu contagiante bom humor, o qual me fez aprender que: "... quem vai não é você, mas sim, seu caminho..."

Ao Professor Marco Stephano, pelas incansáveis orientações da escola e da vida, e por gentilmente me presentear com as membranas de ultrafiltração.

Ao Professor Mauri Sergio Palma pela co-orientação.

Às queridas : Karine Gargione, Ana Morocho, Roberta Polak, Laura Nascimento, Tatiane Ferreira, Aline Ramos e Mariana Deodatto, um sincero agradecimento pelo apoio científico e técnico. Por terem sido amigas e companheiras e por tornarem sempre agradáveis os momentos difíceis do mestrado.

Ao Dennis Chicoma, da Poli-Química pelas análises de Raman, ensaios em equipamento Coulter, análises térmicas e pelos solícitos pronto- atendimentos e apoio científico.

Agradeço a toda equipe de pesquisa do Professor Pedro de Alcântara Pessoa, da Poli- Química, por me emprestarem o espaço no laboratório, pela confiança e amizade.

À amiga Roberta Polak por me presentear com as membranas de diálise.

A todos os funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, em especial ao Juarez, a Mirian, a Elza, ao Gledson e ao Alexandre por estarem sempre dispostos a nos atender por qualquer motivo e em qualquer circunstância.

À empresa Wallerstein, por gentilmente me conceder a papaína.

Extração, caracterização e modificação química da queratina obtida das penas de frango

O aproveitamento de dejetos industriais como fonte de insumos, apresenta além da vantagem econômica pelo uso de materiais de baixo valor comercial, um forte apelo ambiental. A presença de grande produção de resíduos orgânicos em abatedouros, como as penas de frango, leva à necessidade do desenvolvimento de tecnologias que possibilitem a sua reciclagem. As penas se constituem como os materiais queratinosos mais abundantes na natureza, e por isso, podem ser usados como material de partida para diferentes aplicações biotecnológicas, químicas e farmacêuticas. Existem na literatura vários métodos de extração de queratina das penas de frango, como as extrações por hidrólises ácidas e alcalinas, que além da desvantagem da hidrólise total da proteína, rompem também os sítios principais de reação de crosslinkings da proteína. Outros procedimentos envolvem o uso de grandes concentrações de reagentes onerosos, como o 2-mercaptoetanol e as enzimas proteolíticas. Estudo realizado por planejamento fatorial visou à extração e fragmentação da queratina, através da combinação de diferentes concentrações de sulfito de sódio, uréia e papaína. Ensaio preliminares de modificação da queratina foram conduzidos após esta extração. Temperaturas acima de 80°C, e concentrações intermediárias de uréia (3,75M) combinadas a baixas concentrações de sulfito de sódio (0,1M - 0,18M) foram os melhores parâmetros de extração. A hidrólise enzimática apresentou-se adequada somente quando combinada ao prévio tratamento químico. A combinação dos dois processos extrativos resultou em redução do tempo de reação da hidrólise enzimática. A queratina obtida apresentava tamanho de fragmentos homogêneos, ao redor de 650nm, e um grau de pureza de 72%-89% em massa seca de proteína purificada. A caracterização físico-química dos derivados da queratina demonstra a amplitude desta proteína como insumo para aplicações diversas. O estudo da inserção de grupamentos polares na molécula de queratina é feita por análise da solubilidade em diferentes solventes e por espectroscopia vibracional Raman.

Palavras-chave: *Queratina. Proteína. Modificação Química. Ensaio de Caracterização. Raman.*

Extraction, characterization and chemical modification of feather keratin

The use of industrial wastes as a source of raw materials presents, besides the cost-effective advantages, an eco-friendly approach. Great amount of feather waste discharged from slaughterhouses demands the development of biotechnological alternatives for its recycling. Feather is the most keratinous material in nature and may be used for different applications in biotechnology, pharmaceutical and chemical industry. Several authors have written methods for feather keratin extraction, as acid and alkaline hydrolysis. Those methods presented disadvantages like damage to the backbone protein chain and loss of its main function as well as loss of cross linking groups. Other chemical treatments require large amounts of expensive reagents such as 2-mercaptoethanol and proteolytic enzymes. The present work comprises a factorial planning for extraction and fragmentation of feather keratin by combining sodium sulfide (0,1M – 0,26M), urea (2M- 6M) and papain (0,13mg/ml). Feather keratin modification assay was conducted after protein extraction. The experiment presented satisfactory results when temperature extraction is maintained around 80° C, urea is used in an intermediate concentration (3,75M) and sodium sulfide in a low concentration(0,1M-0,18M). Enzymatic hydrolysis is viable only after previous chemistry extraction. The combination of both treatment types resulted in a decrease of enzymatic time reaction and therefore an optimized keratin production. Extracted feather keratin presented homogenous size fragments with most particle diameters around 650nm. The percentage of proteins found was around 72%-89% compared to the total dry weight. The physicochemical characterization of feather keratin derivatives bring this protein of interest as a potencial component to renewable raw materials synthesis. Modification analysis of feather keratin was carried by qualitative solubility evaluation and vibrational spectrometry Raman.

Key-words: *Keratin. Protein. chemical Modification. Characterization Assay. Raman.*

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Sustentabilidade	2
1.2 Resíduos sólidos biodegradáveis como fonte de biomateriais.....	4
1.3 Resíduos provenientes da avicultura	5
1.4 Processos industriais	7
1.5 Proteínas	8
1.6 Processos de extração e hidrólise da queratina.....	10
1.7 Propriedade das queratinas	14
1.7 Síntese dos derivados de queratina	16
1.8 Principal aplicação da queratina.....	18
CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS.....	20
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos	21
CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1 Materiais.....	23
3.2 Métodos.....	23
3.2.1 Processos de extração	23
3.2.1.1 Extração química.....	24
3.2.1.2 Hidrólise enzimática	24
3.2.3 Determinação dos parâmetros analíticos	26
3.2.3.1 Grau de extração em função do tempo	26
3.2.3.2 Grau de fragmentação em função da temperatura	26
3.2.4 Análise da partícula	27
3.2.5 Determinação de atividade proteolítica	27
3.2.6 Metodologias de separação	28
3.2.6.1 Diálise	28
3.2.6.2 Separação e ultrafiltração	28
3.2.6.3 Avaliação de proteínas de baixo peso molecular	29
3.2.7 Porcentagem de proteína no extrato bruto de queratina	30
3.2.7.1 Metodologia micro-kjeldhal	30
3.2.7.2 Eletroforese sds-page	31
3.2.8 Síntese dos derivados de queratina	31
3.2.8.1 Preparo da solução de queratina a 5%	31
3.2.8.2 Síntese da succinil-queratina (qs) e da ftaloil-queratina (qf).....	31
3.2.9 Espectroscopia Raman	33
3.2.10 Solubilidade	34

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	35
4.1 Planejamento fatorial 3X3	36
4.2 Atividade enzimática da papaína.....	37
4.3 Parâmetros de extração: temperatura e tempo	37
4.3.1 Análise do processo de fragmentação em relação à temperatura	38
4.3.2 Análise do processo de extração em função do tempo	39
4.4 Balanço de massas	43
4.5 Avaliação do grau de fragmentação com prévio tratamento químico e posterior hidrólise enzimática.....	46
4.6 Diálise e ultrafiltração	47
4.7 Resultados das sínteses dos derivados de queratina	49
4.8 Caracterização físico-química da queratina	51
4.8.1 Dosagem de proteínas de baixo peso molecular	51
4.8.2 Análise do tamanho dos fragmentos	53
4.8.3 Dosagem proteica do extrato de queratina.....	57
4.8.4 Solubilidade	60
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÃO.....	65
5.1 Conclusão	66
5.2 Sugestões futuras	67
CAPÍTULO 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
6.1 Referências bibliográficas	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Modelo de estrutura secundária das proteínas. A) α -hélice e b) β -folhas extraído de: Schor, R.; Krimm, S. Studies, (1961).	10
Figura 1.2 – Clivagem da ligação dissulfeto por reações de oxidação e redução. Adaptado de Sewald, N.; Jakubke, H.D., (2002).	11
Figura 1.3 – Modelo estrutural da queratina proveniente das penas do frango. Extraído de: fraser, b. R.d.; parry, d. A.d., (2008).	15
Figura 3.1 - Representação do processo de extração e purificação da queratina obtida das penas de frango	25
Figura 3.2 – Foto do processo de extração. 1- 1h; 2- 2h30; 3- 5h.	25
Figura 3.3 – Equipamento de difração dinâmica de luz Coulter N4 Plus	27
Figura 3.4 – Reação de complexação de proteínas em ensaio de dosagem proteica por lowry.	30
Figura 3.5 – Rota sintética dos derivados de queratina na presença de anidrido succínico.	32
Figura 3.6 – Rota de síntese dos derivados de queratina na presença de anidrido ftálico	33
Figura 4.1 – Curva de absorvância em função do volume de solução de papaína 0,05 mg/ml.	37
Figura 4.2 – Análise do processo de fragmentação da queratina por diferentes concentrações de sulfito de sódio e ureia, em função da temperatura de reação.	39
Figura 4.3 - Curva padrão de dosagem proteica por metodologia Bradford	40

Figura 4.4 Análise do processo de extração da queratina por diferentes concentrações de sulfito de sódio e ureia, em função do tempo de reação.	41
Figura 4.5 – Análise do processo de extração por diferentes concentrações de sulfito de sódio e papaína em função do tempo.	42
Figura 4.6 – Concentração de queratina obtida após combinação de prévia extração química e posterior hidrólise enzimática.	47
Figura 4.7 – Espectros de raman da queratina referência q, da queratina + anidrido succínico (QS) e queratina + anidrido ftálico (QF).	49
Figura 4.8 – Espectros de raman da queratina referência: análise de amidas I e II, entre faixa de 1300-1800 cm^{-1}	50
Figura 4.9 – Espectros de raman da queratina + anidrido ftálico: análise da amida I e II nas faixas entre 1300 -1800 cm^{-1}	51
Figura 4.10 - Concentração de proteínas de baixo peso molecular, nos protocolos de extração por sulfito de sódio-ureia.	52
Figura 4.11 - Concentração de proteínas de baixo peso molecular, nos protocolos de extração por sulfito de sódio-papaína.	53
Figura 4.12 - Tamanho de partícula. Extração por sulfito de sódio e ureia.	55
Figura 4.13 – Tamanho de partícula. Extração por hidrólise enzimática.	56
Figura 4.14 –Tamanho de partícula. Combinação da extração química e hidrólise enzimática.	57
Figura 4.15 – Curva padrão de bsa- albumina bovina para metodologia de Lowry ...	59
Figura 4.16 - Queratina solúvel e liofilizada.....	60

Figura 4.17 – Teste qualitativo de solubilidade em solventes diversos da queratina não-modificada, em temperatura de 25°C.....	63
Figura 4.18 – Teste qualitativo de solubilidade em solventes diversos da queratina não modificada, em temperatura de 50°C.....	63
Figura 4.19 – Teste qualitativo de solubilidade em solventes diversos da queratina + anidrido succínico, em temperatura de 25°C.....	64
Figura 4.20 – Teste qualitativo de solubilidade em solventes diversos da queratina + anidrido ftálico, em temperatura de 25°C.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Composição de aminoácidos das penas de frango hidrolisada.....	15
Tabela 4.1 – Dados experimentais da extração química.....	36
Tabela 4.2 - Dados experimentais da hidrólise enzimática.....	36
Tabela 4.3 - Balanço de massas para o protocolo de extração química.....	44
Tabela 4.4 – Balanço de massas para o protocolo de hidrólise enzimática.....	44
Tabela 4.5 – Rendimento do processo de extração química.....	45
Tabela 4.6 - Rendimento do processo de hidrólise enzimática.....	45
Tabela 4.7 – Fração mássica do extrato bruto de queratina, extração química.....	47
Tabela 4.8 – Fração mássica do extrato de queratina, hidrólise enzimática.....	48
Tabela 4.9 – Avaliação de concentração protéica no extrato bruto de queratina....	59
Tabela 4.10 - Quantificação de N total e proteínas nas amostras de extrato bruto do sobrenadante.....	60
Tabela 4.11 - Análise comparativa do grau de solubilidade aparente da queratina não-modificada.....	61
Tabela 4.12 - Análise comparativa do grau de solubilidade aparente da queratina modificada.....	61

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

1.1 SUSTENTABILIDADE

Até fins da década de 60 do século passado, a gestão ambiental das empresas de países desenvolvidos limitava-se a evitar acidentes locais, como as contaminações de água e solo, e a cumprir normas de poluição determinadas pelos órgãos governamentais de controle, as quais se restringiam aos processos de despoluição, isto é, “poluía-se para despoluir”.

É no início dos anos 70 que ocorre um favorecimento de ações coletivas em prol dos movimentos ambientalistas. De acordo com H. D. Thoreau, filósofo do século XIX, que em seu trabalho “Desobediência Civil” já preconizava a importância da participação dos novos atores sociais no gerenciamento do Estado, podemos dizer que assuntos anteriormente indiscutíveis, como os relacionados ao meio ambiente, somam-se na formação de uma mentalidade crítica social, que passa a agir com ações informais dentro da sociedade, voltando-se para a construção de uma ordem democrática, na qual as ações ecológicas ganham força, seja pela via da expansão e valorização dos movimentos ecológicos, seja pela via da organização de entidades do tipo Não-Governamentais (ONGs).

A condição de autonomia conquistada e atribuída às ONGs também facilitou sua presença ativa dentro da sociedade. Essas organizações, em geral desprovidas de uma origem partidária ou ideológica e sustentadas pela contribuição financeira à custa das pesquisas e projetos que desenvolvem, tornaram-se interlocutores ideais de governos e empresas na medida em que não mais representam ameaças a estes, ao contrário dos movimentos sociais. Por sua vez, o governo também passa a promover seu programa social de braços dados com as ONGs, chamando-as à responsabilidade e à cumplicidade com seu programa de ação (CABRAL, A., 2009).

Assim, com o crescimento da preocupação em caráter mundial em se conseguir o desenvolvimento sustentável preconizado pela Rio-92, e o conseqüente aumento do poder de pressão do consumidor, cada vez mais exigente em termos ambientais, as empresas potencialmente poluidoras, preocupadas com sua imagem, procuram adaptar-se ao rigor imposto pela sociedade, reduzindo o seu potencial poluidor.

Surgem então questões relacionadas à sustentabilidade, em que programas de desenvolvimento sustentável passam a ser aventados por diversos setores industriais. A necessidade de uma gestão ambiental sustentável se fortalece à

medida em que recursos como água e energia, anteriormente tidos como recursos inesgotáveis, começam a ser encarados como fontes naturais finitas e a sua escassez, somada a um aumento na escala produtiva industrial e agrícola, resultam na problemática atual do destino empregado aos dejetos (REBOUÇAS, A.C., 2001).

Uma definição geral do desenvolvimento sustentável seria o desenvolvimento que satisfaz as necessidades do presente sem comprometer a capacidade das futuras gerações satisfazerem as suas próprias necessidades (WELTKOMMISSION, 1987).

Para Harborth (1991), desenvolvimento sustentável é um conceito aparentemente indispensável na política de desenvolvimento deste século. Contudo, torna-se evidente que o caminho trilhado pelo crescimento mundial esteja esbarrando em barreiras intransponíveis, como é o caso do avanço econômico chinês, que terá um grande desafio em manter-se sustentável por mais de uma década.

Contudo, apesar da reconhecida importância do desenvolvimento sustentável, a sociedade caminha concretamente para rumos que desafiam qualquer noção de sustentabilidade. Podem-se definir quatro fatores principais que tornam a civilização insustentável a médio e longo prazo: crescimento populacional humano exponencial, depleção da base de recursos naturais, sistemas produtivos que utilizam tecnologias poluentes e de baixa eficácia energética e sistema de valores que propiciam a expansão limitada do consumo material (CAVALCANTI, C., 1994).

Sob o ponto de vista da produção industrial, o desenvolvimento sustentável é encarado com dificuldade pelo produtor, na medida em que há a necessidade de coexistir crescimento produtivo com o uso racional dos recursos naturais e minimização na geração de resíduos poluentes.

O setor industrial descarta anualmente cerca de 86 milhões de toneladas de resíduos sólidos perigosos e não perigosos (conforme “Panorama dos resíduos sólidos no Brasil-2007”). Para minimizar essa problemática, diversas pesquisas são realizadas para avaliar as condições de processamento desses dejetos, de maneira ambientalmente correta e economicamente viável. A reutilização de produtos previamente descartados vem se destacando na realidade industrial brasileira, desde a década de 90, quando passou-se a adotar um setor responsável pelo controle dos dejetos lançados ao meio ambiente. As vantagens da utilização de dejetos como fontes de matérias-primas podem ser delineadas tanto pelo seu baixo custo de

obtenção como também pelo benefício ambiental empregado (PADILHA, A. C. M.; SILVA, T. N.; SAMPAIO, A., 2006).

1.2 RESÍDUOS SÓLIDOS BIODEGRADÁVEIS COMO FONTE DE BIOMATERIAIS

Os “resíduos sólidos” diferenciam-se do termo “lixo” porque, enquanto este último se compõe de objetos que não possuem qualquer tipo de valor ou utilidade, porções de materiais sem significado econômico, sobras de processamentos industriais ou domésticos a serem descartadas, enfim, qualquer coisa que se deseje jogar fora, o resíduo sólido possui valor econômico agregado por possibilitar o reaproveitamento no próprio processo produtivo (DAROLT, M. R., 2002).

Os resíduos classificados como orgânicos são todos aqueles materiais que apresentam uma constituição propícia à biodegradação natural, devendo ser excluídos dessa classificação produtos de papel e derivados que apresentem condições adequadas à reciclagem. Os resíduos ditos biodegradáveis, como resíduos alimentares, de jardim, lamas de depuração ou papel contaminado, são constituídos por matéria putrescível, passível de degradação aeróbia (presença de oxigênio) ou anaeróbia (ausência de oxigênio) (ENERGAIA, 2009).

Os resíduos biodegradáveis têm como origem os diversos setores de atividade humana, seja o setor doméstico, o comercial, o setor industrial de alimentos e agrícola, as estações de tratamento de águas residuárias, as explorações agropecuárias, até a limpeza de jardins e logradouros. A sua margem de produção depende do tipo de setor produtor, sendo relevante a produção da indústria agroalimentar. Segundo inventário realizado pela CETESB, em 1999, o Estado de São Paulo produziu cerca de 500 mil toneladas de resíduos sólidos perigosos, dos quais 50% são tratados, 30% armazenados e 20% depositados no solo. Além disso, são produzidas aproximadamente 20 milhões de toneladas de resíduos não inertes e 1 milhão de toneladas de resíduos inertes (CETESB, 2009).

A Embrapa juntamente com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento apresentou recentemente o Plano Nacional de Agroenergia, estabelecido em 2006 e que tem como missão promover o desenvolvimento sustentável e a competitividade do agronegócio, contemplando o desenvolvimento de matriz energética por meio da reutilização dos resíduos agropecuários e seu

aproveitamento em coprodutos na indústria de alimentos, química e agrícola (EMBRAPA, 2006).

Um exemplo prático de construção da matriz energética a partir de resíduos agrícolas são os chamados biodigestores. Esses aparelhos utilizam dejetos de aves, suínos e bovinos como fontes de matéria-prima, bem como outros compostos orgânicos, como: restos de cultura, capins, lixos residenciais e agroindustriais, transformando-os em fontes energéticas, pela produção do gás metano, além de obter um excelente biofertilizante, biomaterial de ampla aplicação como adubo. O uso do biodigestor permite dar novo destino ao esterco recolhido, que muitas vezes é lançado nos rios ou armazenado em locais não apropriados (MENEZES, J.F.S.; ANDRADE, C.L.T.; ALVARENGA, R.C.; KONZEN, E., PIMENTA, F.F., 2002).

Os biomateriais proteicos provenientes de fontes naturais como: colágenos, queratinas, ácido hialurônico, fibrinogênio, fibrina e os provenientes de ossos demineralizados e quitosanas, apresentam diferentes aplicações, como por exemplo, na síntese de tecidos, de biofilmes e biomembranas. Esses biomateriais, por promoverem um substrato natural para proliferação e diferenciação celular, são muito utilizados pela engenharia de tecidos (CHU, P.K.; LIU, X., 2008).

1.3 RESÍDUOS PROVENIENTES DA AVICULTURA

A ascensão na cadeia produtiva das indústrias avícolas apresenta como dejetos uma grande disposição de resíduos orgânicos, caracterizados como produtos sem fins comerciais que, se descartados diretamente ao meio ambiente, causam grande impacto poluidor. Na avicultura, podemos definir como resíduos sólidos: as penas, vísceras, cabeças, pés, carcaças, peles e ossos diversos. Entre os resíduos líquidos: sangue, borra do flutador e efluentes líquidos; e os resíduos gasosos, constituídos pelos gases provenientes da biodigestão do esterco dos animais (BOUSHY, A. R. El.; B VAN DER POEL, A. F., 1990).

Dentro do agronegócio, em termos de cadeia produtiva, a avicultura é considerada uma das mais organizadas e competitivas na economia mundial. Por se tratar de uma atividade de extrema competição, essa cadeia sofre pressões tanto no processo inicial quanto na transformação do produto. Analisando-se a etapa da transformação, percebe-se que a cadeia produtora da avicultura é responsável pela

agregação de valor ao produto final, que se revela pela incorporação de tecnologias geralmente relacionadas com as inovações incrementais e radicais em produtos e processos que estejam alinhadas à preferência de seus consumidores finais.

Para tanto, aspectos relacionados ao meio ambiente assumem importância na dinâmica dos negócios da cadeia produtiva de frangos, especialmente no atual contexto, permeado pelas exigências legais e mercadológicas, que pressionam as organizações de qualquer natureza a se adequarem aos padrões exigidos. Assim, surge o questionamento: quais são as formas de aproveitamento ou destino ecologicamente correto dos resíduos sólidos e líquidos gerados num abatedouro de aves? (PADILHA, A. C. M.; SILVA, T. N.; SAMPAIO, A., 2006).

Na escala produtiva, esses resíduos apresentam-se como matéria integrante da cadeia de produção final da indústria, que necessita de tratamento prévio para sua posterior utilização. O destino da maior parte dos dejetos de penas encontra-se na indústria de alimentos, na qual os subprodutos biologicamente proteicos são processados por incineração e compostagem, em que se obtém uma farinha de penas, que na maioria das vezes é adicionada em rações animais, como também em alimentos de consumo humano.

Contudo, essa farinha caracteriza-se como um produto de baixo valor nutricional, pois apresenta deficiências de resíduos como metionina, lisina, histidina e triptofano, considerados aminoácidos essenciais para nutrição animal. Além disso, a presença das inúmeras ligações dissulfeto, como é presente nas queratinas das penas, resulta em baixa digestibilidade dos animais alimentados com esta ração. (BERTSCH, A., 2005).

Em uma escala mundial, estima-se a produção anual de 65 milhões de toneladas de penas oriundas da produção de carnes de frango. Segundo dados da empresa Perdigão, no ano de 2003, na unidade de Serafina Corrêa, a produção diária de subprodutos foi de 80 toneladas de resíduos sólidos. Dentre estes, 18,5 toneladas eram constituídas somente de penas.

De maneira geral, as penas representam aproximadamente 10% da massa corpórea dos frangos de abate, variando essa proporção de acordo com o peso corpóreo do animal (GRAZZIOTIN, A.; PIMENTEL, F.A., SANGALI, S; JONG, E.V.; BRANDELLI, A., 2006).

Além da importância na defesa, na regulação de temperatura corpórea e na locomoção das aves, as penas simbolizam os materiais queratinosos mais

abundantes na natureza. (ONIFADE, A.; AI-SANE, N.; AI- MUSALLAM, A.; AI-ZARBAN, S., 1998).

1.4 PROCESSOS INDUSTRIAIS

Determinados controles de reações químicas são comuns a escalas laboratoriais e industriais, entre eles estão: o balanço de massas, balanço de energia, estudo cinético e determinações de propriedades físicas e químicas dos compostos presentes na reação (CORREIA, P.B.,2001).

A seguir, listamos os principais fatores a serem considerados:

- Escolha de matérias-primas de baixo custo operacional e em quantidades disponíveis no mercado;
- Escolha adequada do equipamento industrial;
- Análise econômica do processo empregado;
- Escolha de uma reação química que permite obter um produto final suficientemente puro, ou em que sua purificação seja economicamente interessante;
- Cinética química que permite a finalização da reação num tempo economicamente viável;
- Escolha das condições reacionais que promovam uma favorável taxa de conversão das matérias-primas no produto final;
- Redução dos volumes de solventes ao mínimo quimicamente possível, reduzindo as dimensões dos reatores e o custo de recuperação dos solventes empregados;
- Os subprodutos e as matérias-primas devem ter baixa corrosão para o equipamento;
- O tratamento de efluentes líquidos, gasosos e sólidos deve ter os custos compatíveis com a economia do processo;

1.5 PROTEÍNAS

As proteínas constituem a maior fração de biopolímeros contidos em todos os organismos, respeitando a sua diversidade e massa.

Apresentam ampla função biológica, promovendo desde rigidez e flexibilidade até catálise de sistemas biológicos. A resposta para essa grande variedade de funções consiste na sua estrutura molecular, com específica reatividade química de seus aminoácidos e seu arranjo espacial, identificando a sua conformação ativa e, conseqüentemente, sua atividade funcional específica (COPELAND, R.A., 1994).

Podem-se dividir em proteínas fibrosas, as quais apresentam cadeias polipeptídicas arranjadas em longas fitas ou folhas, e em globulares, que apresentam cadeias polipeptídicas dobradas em uma esfera ou formato globular. Os dois grupos são também estruturalmente distintos: proteínas fibrosas geralmente em um tipo único de estrutura secundária (NELSON, D. L., COX, M.M., 2000).

As proteínas se estruturam e organizam-se em níveis estruturais denominados de primário, secundário, terciário e quaternário. A estrutura primária de uma proteína relaciona-se com a sequência dos resíduos de aminoácidos que constituem sua cadeia polipeptídica. A estrutura secundária é produzida por ligações de hidrogênio entre as cadeias para formar sequências e domínios com alta simetria interna. Essa estrutura é particularmente evidente nas proteínas fibrosas, em que as cadeias polipeptídicas apresentam uma conformação estendida ou espiralada longitudinalmente. Existem três conformações secundárias possíveis: alfa-hélice, folhas-beta e tripla-hélice. A conformação alfa-hélice está comumente presente em proteínas fibrosas, e se apresenta como a de menor energia livre, formando-se espontaneamente. Esse tipo de conformação confere à proteína grande elasticidade devido ao estiramento máximo da cadeia, no qual as ligações de hidrogênio são quase paralelas ao eixo da hélice. A estrutura β -folhas é adotada por cadeias peptídicas que não podem formar facilmente a estrutura α -hélice. Corresponde a cadeias em zigue-zague que se arranjam lado a lado para formar uma estrutura parecida com uma série de pregas. Neste arranjo, as ligações de hidrogênio são formadas entre segmentos adjacentes e podem ser paralelas ou antiparalelas dependendo de como uma cadeia está disposta em relação à vizinha. Este arranjo estrutural confere alta resistência à tensão e, conseqüentemente, maior rigidez à fibra. A estrutura quaternária dessas moléculas consiste em feixes paralelos de fibrilas lineares individuais, formadas por cadeias polipeptídicas torcidas em espiral e enroladas umas ao redor das outras, formando uma grande hélice unida através de

ligações de hidrogênio. Por causa da interação entre os vários tipos de cadeia lateral na proteína e do relativo grau de interação diferenciada com a molécula de água, a forma mais comum da proteína é forma quaternária. (FRANK, 1993).

Uma proteína apresenta-se sob distintas formas, desde suas micro-conformações, como os aminoácidos, até polímeros, como as proteínas de alto peso molecular. Vários fatores, como temperatura, pH e concentração de solutos podem afetar o equilíbrio conformacional da proteína, promovendo a estabilização no seu estado nativo, ou desnaturação.

Desnaturação de proteínas é definida como alteração da conformação em todas as partes de sua molécula, acarretando a perda de sua atividade biológica e funcionalidade. O processo de desnaturação não envolve alterações da estrutura primária, mas de todas as outras (secundária, terciária e quaternária). A proteína desnaturada é geralmente menos solúvel ou mesmo insolúvel (RIBEIRO, E.P.; SERAVALLI, E.A.G., 2007).

A estabilidade da proteína aumenta com a solvatação. Sabe-se que nas proteínas globulares, os aminoácidos hidrofóbicos se localizam na parte interna dos glóbulos, enquanto os grupos polares estão situados na parte externa e expostos ao solvente. Em face dessa organização, camadas de água apresentam-se ligadas à superfície da proteína numa proporção de 0.2g de água/0.5g de proteína. No caso da gelatina (colágeno desnaturado), a água ligada representa 99 vezes o valor de sua massa. A presença da água na proteína eleva a sua estabilidade à desnaturação e, conseqüentemente, aos processos de extração e hidrólise. Portanto, a presença de calor em forma de aquecimento durante o processo de extração proteica é fundamental para a reação de extração química. (RIBEIRO, E.P.; SERAVALLI, E.A.G.,2007).

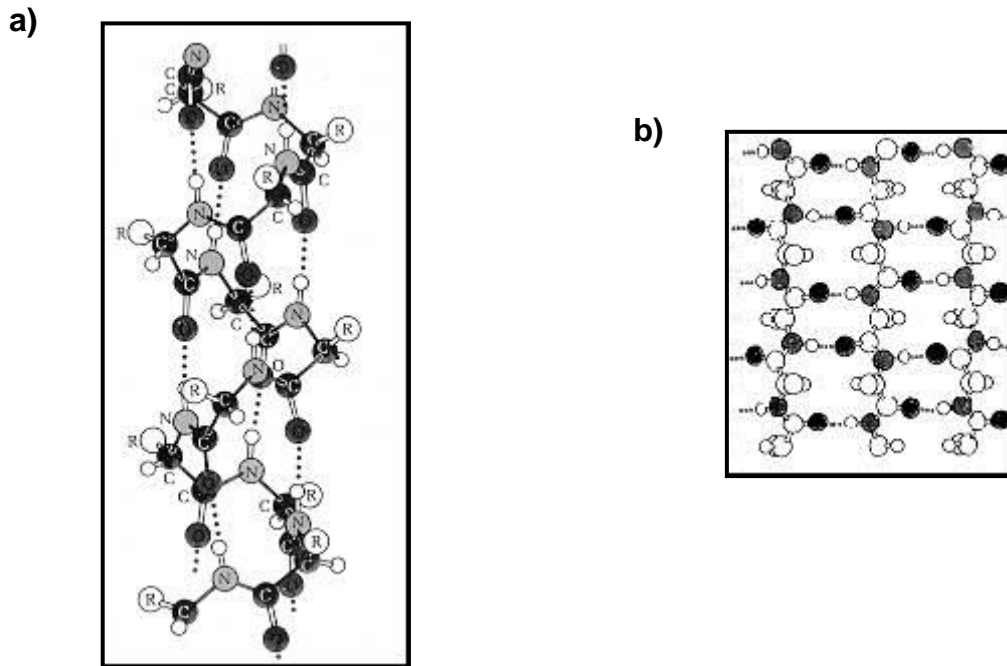


Figura 1.1 – Modelo de estrutura secundária das proteínas. a) α -hélice e b) β - folhas Extraído de: Schor, R.; Krimm, S. Studies, (1961).

1.6 PROCESSOS DE EXTRAÇÃO E HIDRÓLISE DA QUERATINA

Os primeiros ensaios de beneficiamento da queratina datam do final da década 30, quando se utilizava a lã como matéria-prima. Os processos de hidrólise química faziam uso de uma mistura dos agentes caotrópicos, como o tioglicolato de amônio e ureia, bem como de hidróxido de sódio, misturas contendo HCl, tributilfosfina ou peróxido de hidrogênio (KAWASAKI, G.H,1990; WOLSKI, T., 1981).

Atualmente, soluções contendo ureia e 2-mercaptoetanol são comumente empregadas, resultando na quebra das pontes dissulfeto. Contudo, o custo desses reagentes pode inviabilizar a produção em grande escala dessa proteína numa indústria. (POOLE, A.J., 2009).

Desta forma, torna-se necessário trabalhar com um bom sistema de solução, apresentando alta estabilidade, fácil manuseabilidade de processamento e viabilidade econômica e ambiental.

Diversas endopeptidases são escolhidas para fragmentação enzimática completa e específica de proteínas. Contudo, muitas vezes tal processo apresenta

maior tempo de reação e pode resultar numa degradação incompleta do substrato. (SEWALD, N.; JAKUBKE, HD, 2002).

A clivagem das ligações dissulfeto é necessária para a separação das cadeias peptídicas e também na destruição da conformação proteica e peptídica quando estas são estabilizadas por esse tipo de ligação. O processo de clivagem envolve hidrólise da proteína sob condições que minimizam o risco de trocas entre as ligações de dissulfeto. Ligações intracadeia e intercadeia podem ser clivadas por oxidação ou redução. (SEWALD, N.; JAKUBKE, HD. 2002).

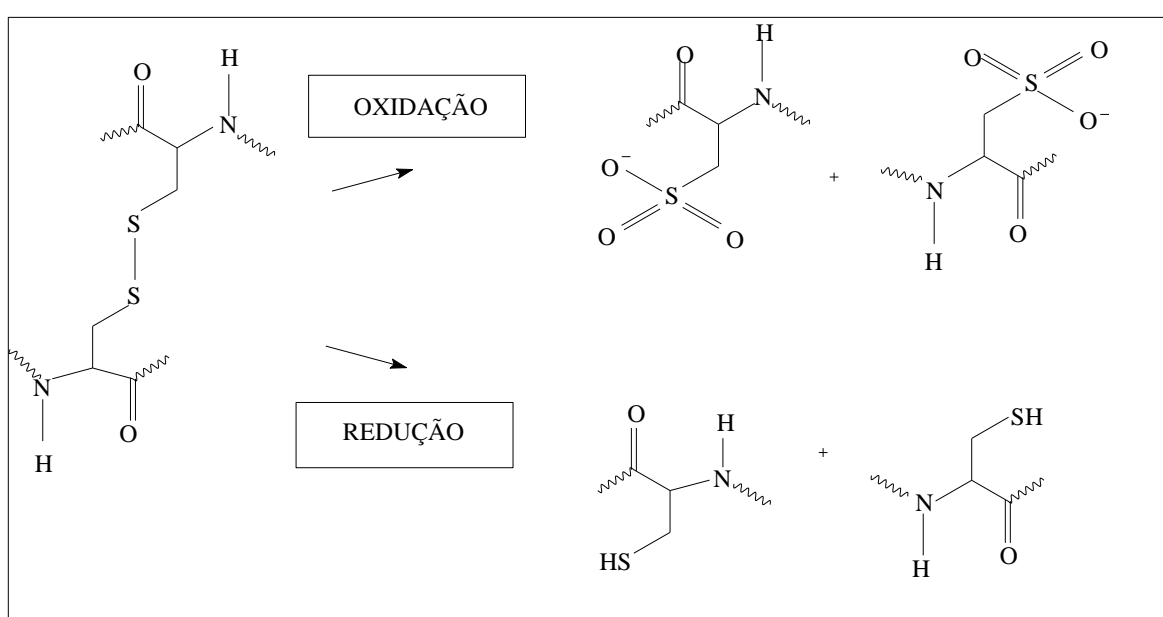


Figura 1.2 – Clivagem da ligação dissulfeto por reações de oxidação e redução. Adaptado de SEWALD, N.; JAKUBKE, H.D., (2002).

Os processos de oxidação convertem todos os resíduos cisteínicos em ácidos cisteicos. Desde que os ácidos cisteicos sejam estáveis em condições ácidas e básicas, é possível determinar o total de resíduos Cis presentes no ácido cisteico.

A clivagem por reação de redução resulta na formação de grupos tiólicos, os quais permitem a conjugação com determinados agentes, tanto para prevenir a reoxidação da cadeia, como também para reação de crosslinkings. É interessante que haja a completa dissolução da queratina, com exceção da sua aplicação na indústria têxtil. Contudo, soluções aquosas de queratina tornam-se instáveis e precipitam diante de sua baixa solubilidade em água quando estocadas, sob condições de baixa temperatura (ALEMDAR, A. IRIDAG, Y. KASANCI, M., 2005).

Zahn (1961) determinou que a troca entre SH/SS ocorre durante o processo de ajuste da molécula no meio reacional, e que a sua estabilidade ocorre devido à formação de lantionina, a qual se forma concomitantemente ao processo de quebra da ligação dissulfeto.

O ajuste permanente é devido à quebra das ligações dissulfeto SS, tanto pela fervura da água, como pela presença de agentes redutores, seguida de crosslinkings que estabilizam a conformação da proteína. (ZAHN, H.; KUNITZ, F.W.; MEICHELBECK, H. 1961).

Assim, é importante salientar as condições de reação de crosslinkings dessa proteína com agentes que permitam maior solubilidade aquosa e estabilidade nos sistemas de formulação cosmética. Os hidrolisados proteicos podem ser obtidos basicamente por três métodos: a hidrólise alcalina, a hidrólise enzimática e a hidrólise ácida (ADLER-NISSEN, 1986; LAHL, W.; BRAUN, S.D,1994).

A hidrólise ácida é amplamente praticada nas indústrias de alimentos, utilizando-se como reagente o ácido clorídrico devido ao seu custo relativamente reduzido, à rapidez e à produção de sabor agradável (FOUNTOULAKIS, M.; LAHM, HW., 1998). Na neutralização do ácido clorídrico com NaOH, ocorre uma elevada produção de sal (NaCl) no hidrolisado. Apesar da importância da hidrólise ácida na produção de aromas cárneos, a produção de glicerol cloridrinas, especialmente a 3-cloro-1,2 propanediol e a 1,3-dicloro-2-propanol, torna-se um problema quando essa metodologia é utilizada, visto que esses compostos estão sendo associados à infertilidade masculina e a mutações em bactérias (VELÍZEK, 1991).

No caso de hidrólise por enzimas proteolíticas, o ataque à ligação peptídica independe do tamanho da cadeia peptídica do substrato, mas sim da natureza dos aminoácidos das cadeias laterais e também da presença de grupamentos iônicos próximos aos sítios de clivagem.

As exopeptidases ou peptidases promovem a hidrólise de ligações peptídicas próximas ao grupo alfa-carboxil ou ao grupo alfa-amino, e no caso de dipeptidases, ambos os grupos devem ser adjacentes ao sítio de clivagem.

Exemplos de exopeptidases: carboxipeptidases, extraídas de tecidos animais, como o pâncreas; aminopeptidases, como a leucina aminopeptidase; dipeptidases: glicilglicina dipeptidase, extraída de tecidos animais.

As endopeptidases atacam as ligações peptídicas localizadas centralmente, como as ligações peptídicas terminais. Esta classe de enzimas inclui: pepsina, tripsina, quimotripsina, papína, ficina, entre outras.

Como resultado, as condições de processamento a que a proteína é exposta podem resultar em diversas alterações na cadeia lateral dos aminoácidos. Em condições alcalinas, ocorre a racemização de aminoácidos e ligações cruzadas, resultando em mudanças significativas de sua funcionalidade. Os aminoácidos arginina, treonina, cistina, serina e cisteína são lentamente destruídos, enquanto glutamina e asparagina são deaminadas em condições alcalinas. Em meio ácido, o triptofano é rapidamente destruído, principalmente em presença de temperaturas elevadas. Aminoácidos sulfurosos são destruídos na presença de produtos oriundos da oxidação de lipídeos.

Os aminoácidos provenientes da queratina e comercializados no mercado são obtidos por processos de hidrólise ácida na presença de grandes concentrações de HCl. A maior desvantagem deste processo para a extração de queratina consiste na desestruturação da conformação primária da cadeia proteica, havendo rompimento das ligações de hidrogênio que levam à perda da sua atividade proteica (HOOD, C.M., HEALY, M. G., 1994).

Os processos de hidrólise resulta em aglomerado de aminoácidos, enquanto que a extração por sulfitólise, na presença de bissulfitos e de ureia em concentrações abaixo de 6M, resulta na formação de uma mistura de peptídeos, com diferentes frações moleculares. (KIM, W.K.; LORENZ, E.S.; PATTERSON, P.H., 2002).

O tempo de reação empregado varia de 2 horas (em ensaios na presença de ácidos e bases fortes) a 72 horas, na presença de enzimas. A temperatura de reação varia de acordo com o procedimento empregado. Na presença de ácidos e bases fortes, a temperatura atinge até 70° C, tendo um aumento de temperatura quando na presença de sais redutores e agentes caotrópicos. Na hidrólise enzimática a temperatura não sofre muitas variações, atingindo valor de temperatura adequada com o ótimo de atividade de cada enzima (TOYODA, H. 1966; INAGATA, S., 1997).

1.7 PROPRIEDADE DAS QUERATINAS

A queratina proveniente das penas é morfologicamente caracterizada como proteína pequena, com peso molecular em torno de 10kDa, e com tamanho uniforme. A sua constituição rica em cisteínas e resíduos hidrofóbicos explica o seu caráter insolúvel tanto em solventes polares quanto em apolares. Além da composição dos aminoácidos, a queratina apresenta uma conformação estrutural do tipo folhas- β . Esses arranjos estruturais moleculares conferem rigidez à pena, caracterizando a sua função principal como apêndices epidérmicos de proteção (NELSON, D. L., COX, M.M., 2000).

Essa estrutura tridimensional, além de conferir uma maior insolubilidade dessa proteína em diferentes solventes, proporciona também uma maior estabilidade físico-química sob condições de temperaturas e pressões elevadas, bem como resistência ao ataque de enzimas proteolíticas, como: a pepsina, tripsina e papaína (GOUSTEROVA, A., 2005).

Na queratina, é identificado um total de 20 resíduos diferentes, mas sua proporção varia de acordo com o tipo de fonte do qual provém (BENDIT, E.G.; FEUGHELMAN, M., 1996).

Os aminoácidos contribuem para a estabilidade da proteína, que contém um grupo amino e um grupo carboxil, ligados ao mesmo átomo de carbono alfa. Estes grupos diferem um do outro nas suas cadeias laterais ou grupos R que variam em estrutura, tamanho e carga elétrica e influenciam na sua solubilidade. Esses resíduos são unidos através de pontes dissulfetos, formando uma cadeia polipeptídica. Todas as proteínas fibrosas são insolúveis na água. Essa propriedade se deve pela alta concentração de aminoácidos hidrofóbicos presentes tanto no interior quanto na superfície da proteína (NELSON, D. L., COX, M.M., 2000). Na figura 1.3, as esferas coloridas delineiam as localidades aproximadas das cadeias laterais. Esferas verdes: sítios hidrofóbicos; azuis claras: ligações de hidrogênio; vermelhas: ramificação ácida; azuis escuras: ramificação básica; amarelas: resíduos de cistina; cinzas: resíduos de glicina.

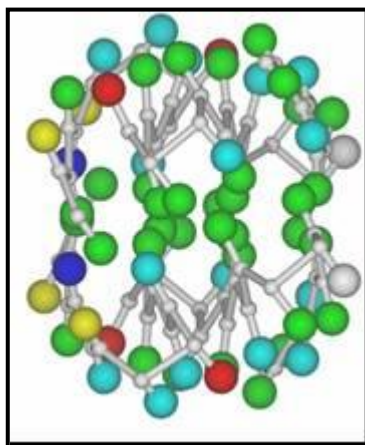


Figura 1.3 – Modelo estrutural da queratina proveniente das penas do frango. Extraído de: FRASER, B. R.D.; PARRY, D. A.D., (2008).

Existem inúmeras referências que definem a quantidade e os tipos de resíduos presentes nas penas de frango. O conhecimento das propriedades químicas desses resíduos consiste numa poderosa ferramenta para elaborar o meio de extração mais viável. Segundo GHOSH, A.; CHAKRABARTI, K.; CHATTOPADHYAY, D, (2008), a composição aminoacídica proveniente da hidrólise enzimática das penas de frango é mostrada na tabela a seguir:

Aminoácido	C (µg/ml)
Ácido aspártico	2,7
Treonina	4,9
Serina	2,59
Ácido Glutâmico	4,6
Prolina	1,44
Glicina	2,36
Alanina	2,27
Valina	2,23
Metionina	0,633
Isoleucina	2
Leucina	3,35
Tirosina	3,59
Fenilalanina	1,67
Histidina	3,4
Lisina	9,5
Triptofano	1,33
Arginina	2,5

Tabela 1.1 – Composição de aminoácidos da penas de frango hidrolisada

Os aminoácidos podem ser classificados em cinco classes principais, baseadas nas propriedades dos seus grupos R, em particular, sua polaridade ou tendência de interagir com água em pH biológico (próximo pH 7).

A polaridade dos grupos R varia grandemente desde os não polares e hidrofóbicos (insolúveis em água) até os altamente polares e hidrofílicos (solúveis em água). Os resíduos mais relevantes na queratina são os grupos R polares não carregados, formados pela serina, cisteína, e pelos grupos R não polares alifáticos, constituídos pela glicina e prolina.

A glicina, embora seja não polar, tem sua cadeia lateral muito pequena e não apresenta contribuição real para as interações hidrofóbicas. As regiões polipeptídicas contendo prolina apresentam conformação rígida que reduz a flexibilidade estrutural dessas regiões.

Os grupos R aromáticos apresentam-se em concentrações reduzidas na molécula de queratina e são relativamente não polares, além disso, podem estar relacionados com as interações hidrofóbicas. O grupo hidroxila da tirosina pode formar pontes de hidrogênio, sendo este um importante grupo funcional para atividade enzimática.

A classe de aminoácidos compostos por serina, treonina, cisteína, asparagina e glutamina é constituída por grupos funcionais que formam pontes de hidrogênio com a água. A polaridade da serina e treonina é oferecida por seus grupos hidroxilas; a da cisteína, pelo seu grupo sulfidril; e as da asparagina e glutamina, pelos seus grupos amidas. A asparagina e glutamina são facilmente hidrolisados por ácidos e bases, enquanto os grupos de cisteína são facilmente oxidados, formando um aminoácido dimérico denominado cistina, unido de maneira covalente por pontes dissulfeto. Os resíduos unidos pela ponte dissulfeto são fortemente hidrofóbicos (NELSON, D. L., COX, M.M., 2000).

1.8 SÍNTESE DOS DERIVADOS DE QUERATINA

Os processos de extração para obtenção de queratina adequa-se à aplicação final do produto. O procedimento de extrusão, que envolve extração por agente redutor, em quantidades mínimas, e na presença de glicerina, resulta na formação de filmes de queratina. Esses biofilmes apresentam propriedades favoráveis para

estabilização mecânica em polímeros, como aumento da sua estabilidade físico-química, podendo formar fibras, filmes ou embalagens biodegradáveis (BARONE, J.R.; SCHMIDT, W. F.; GREGOIRE, N. T., 2006).

A utilização da queratina também se estende como fonte de insumos para utilização em sistemas de liberação controlada, como na liberação de ativos farmacêuticos, herbicidas, flavorizantes, perfumes entre outros (FLORIS, T.; ARNOLDS, G., 2006).

As penas de frango tratadas por processos mecânicos ou de hidrólise química, em presença de ácido ou bases fortes, são utilizadas para a fabricação de suplementos alimentares, fertilizantes, colas, foils ou na produção de aminoácidos e peptídeos para adição em cosméticos. (FRIEDRICH, A.B.; ANTRANIKIAN, G., 1996).

A capacidade de dissolução da queratina em água e em outros solventes é geralmente importante para aplicação final desta proteína. Embora a extração da queratina ocorra sob diferentes protocolos, o produto final caracteriza-se como pouco solúvel e precipita quando estocado em longos períodos e sob baixa temperatura. Diante do exposto, torna-se importante encontrar um sistema de dissolução de alta estabilidade e facilmente reproduzível, para que possa ser utilizado como material de compósitos ou crosslinkings dessa queratina, tornando-a mais solúvel nos meios apropriados e de fácil análise. (BARONE, J.R.; SCHMIDT, W.F., 2006).

Uma distinção importante entre a queratina e as proteínas representantes do grupo das fibrosas, como o colágeno, a elastina e as proteínas miofibrilares, consiste na presença de grande concentração de resíduos cisteínicos, presente nas ligações dissulfeto entre os grupamentos diméricos dos aminoácidos da cistina. Pela presença extensiva desses crosslinkings e a alta concentração de resíduos hidrofóbicos, a queratina é caracteristicamente insolúvel tanto em solventes polares – por exemplo, a água –, como em solventes apolares.

Sais, como o sulfito de sódio, os quais rompem as ligações dissulfeto, mantêm essas pontes reduzidas até a sua dissolução no meio reacional. Após o processo de diálise, com a saída desses sais, formam-se extensivas agregações proteicas, levando a formação de suspensões em forma de géis opacos de proteína. Para contornar esse problema e obter uma solução estável, utiliza-se como alternativa a adição de grupamentos polares aos potenciais sítios de ligação. No caso da queratina, a incorporação dos grupos polares ocorre aos grupamentos tiólicos e nas

amidas I e III (SCHROOYEN, P.M.M.; DIJKSTRA, R.C.O.; BANTJES, A.; FEIJEN, J., 2001).

1.9 PRINCIPAL APLICAÇÃO DA QUERATINA

Atualmente, os cosméticos para tratamento de cabelos consistem na principal aplicação industrial da queratina.

Um dos primeiros produtos cosméticos a conter em sua composição queratina focava-se no tratamento para crescimento capilar. Este era derivado da hidrólise de uma mistura proveniente dos pêlos de coelho e cabelo humano. (BROOKS, G.J., 1983.)

A queratina utilizada industrialmente atualmente provém de fontes como pêlos e pele de animais – como o porco –, bem como de cabelo humano, sendo o último um insumo de alto valor agregado (SBRT, 2007).

Sabe-se que a permeação capilar de compostos presentes nos produtos cosméticos refere-se às propriedades eletrostáticas do fio. Quanto maior o dano físico no capilar, maior será a sua concentração de moléculas de cargas negativas. (SILVA, C.J.S.M.; VASCONCELOS, A. CAVACO-PAULO, A., 2007).

Os peptídeos da queratina, compostos de grupamentos de aminoácidos e peptídeos de baixo peso molecular, possivelmente se ligam à queratina do cabelo, restaurando as estruturas proteicas danificadas, uma vez que formam uma proteção para a cutícula. Estes peptídeos podem penetrar nas cutículas capilares tanto pela força eletrostática quanto pelo tamanho de sua molécula. Assim, torna-se importante para essa finalidade cosmética a presença de proteínas de baixo peso molecular, catiônicas e que estejam numa concentração de aproximadamente 10% (p/p) em uma formulação (VILLA, A. L.V.; ARAGÃO, M. R. S.; MAZOTTO, A. M.; VERMELHO, A. B., SANTOS, E. P., 2008).

Os benefícios gerados ao cabelo pelo tratamento à base de queratina podem ser: melhoria da manuseabilidade, melhoria no brilho e na textura, revestimento do fio danificado pelo uso de secadores, escovas, tinturas etc. e aumento da retenção hídrica capilar (BROOKS, G.J., 1983). Mais recentemente, observou-se que a queratina apresenta absorção na faixa espectral de 200nm a 300nm, característica

esta que pode permitir o emprego da queratina na prevenção de danos solares aos fios de cabelos (TING; C.; YAOMING; Z.; CHONGLING, Y, (2007).

CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudo comparativo de diferentes protocolos de extração da queratina obtida das penas de frango, elaborado por planejamento fatorial.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterização físico-química da queratina;

Síntese e caracterização dos derivados de queratina..

CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

As penas de frango utilizadas foram fornecidas pela empresa Comércio de Penas – Sono Leve Ltda. e previamente lavadas com água e solução de dióxido de cloro (produto comercialmente vendido como Veromax 80) durante 12 horas, para remoção total de sua cobertura oleosa, bactérias e fungos.

Os reagentes, ureia, sulfito de sódio, anidrido succínico, anidrido ftálico, ácido clorídrico, ácido sulfúrico e hidróxido de sódio, são de grau técnico.

A cisteína e a albumina bovina BSA empregadas eram da Sigma-Aldrich.

A papaína 750 MS foi concedida pela empresa Wallerstein Ind. e Com. Ltda.

Os equipamentos utilizados para os processos de extração foram: agitador mecânico Spencer SP 142-22, membranas de ultrafiltração Sartorium de *cut-off* entre 10 kDa e 50kDa, estufa, bomba à vácuo, espectrofotômetro UV- 1800 Shimadzu, Coulter N4 Plus, Raman Bruker IFS 28/N X, chapas de aquecimento Fisatom, processador de facas Britannia, papel filtro Whattman .40, filtro de tecido tipo Perfex, banho termostático.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 PROCESSOS DE EXTRAÇÃO

Inicialmente, as penas secas eram dilaceradas em processador de facas, de forma a aumentar a sua superfície de contato com os reagentes.

As misturas foram preparadas na proporção de 15:1 de solução catalítica-penas. O solvente utilizado para dissolução dos reagentes foi água destilada. A cada duas horas após o aquecimento do meio, a biomassa era triturada em processador mecânico de lâminas. O procedimento completo pode ser demonstrado pelo fluxograma de produção (Figura 3.1).

3.2.1.1 EXTRAÇÃO QUÍMICA

A extração química da queratina consistiu na combinação da solução salina de sulfito de sódio 0,1M-0,26 M, e solução de ureia 2M-6M. O solvente utilizado era a água, na proporção de (1,5: 0,1) em massa de penas. O estudo dessa reação ocorreu em faixa de pH 8-9, variando-se as temperaturas e o tempo de reação, numa condição de constante agitação do meio.

3.2.1.2 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A concentração de papaína foi estabelecida de acordo com resultado da atividade enzimática demonstrado em 3.2.4.1. Esta coincide com protocolo proposto por BLACKBURN, S., (1950), que estudou os processos de hidrólise da lã com distintas enzimas proteolíticas. A enzima empregada era a papaína 750 MS, na concentração entre 0,13 mg/ml – 0,26 mg/ml, e ativada com solução de sulfito de sódio à 0,1M. A reação ocorre em temperatura constante de 65°C, e pH 6 – 8, estabelecida como uma faixa ótima de reação enzimática da papaína, seguida de constantes agitações. O estudo dessa reação ocorreu em diferentes tempos de reação.

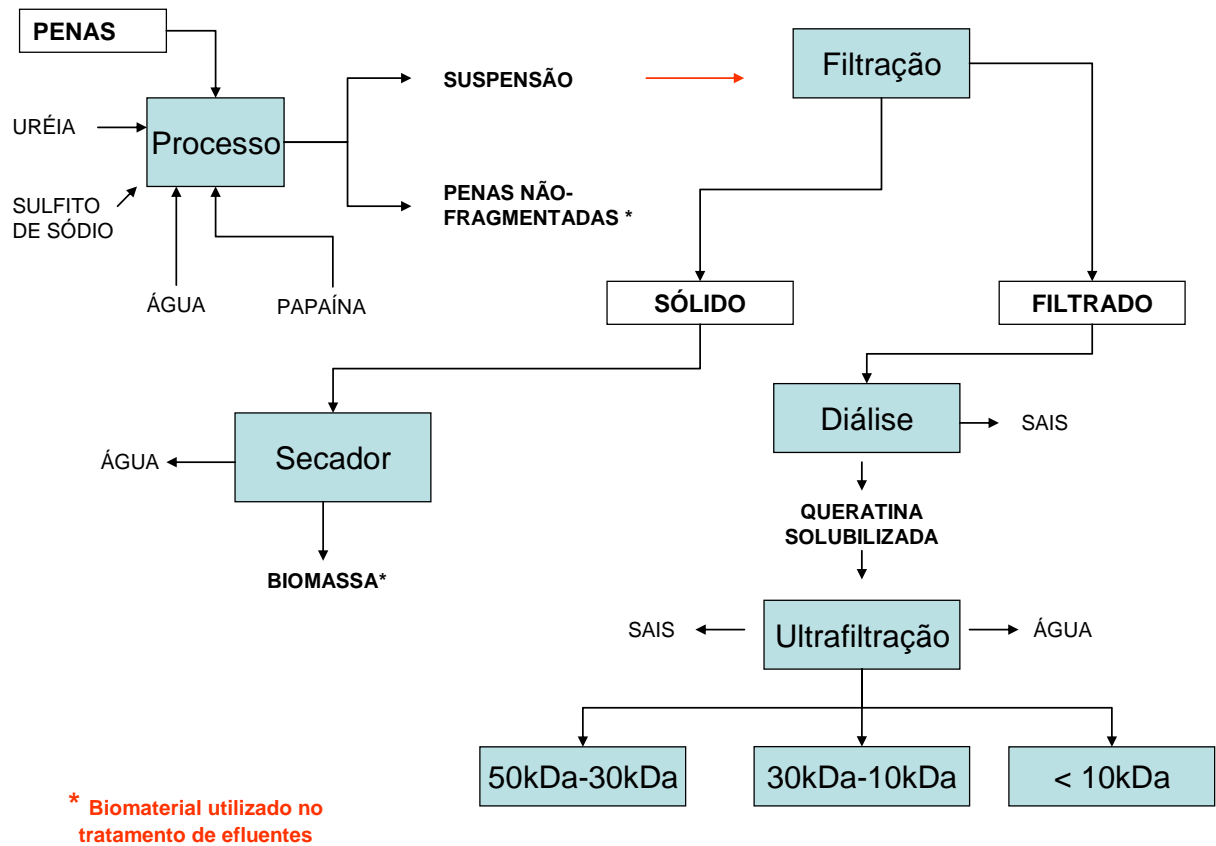


Figura 3.1 – Representação do processo de extração e purificação da queratina obtida das penas de frango.

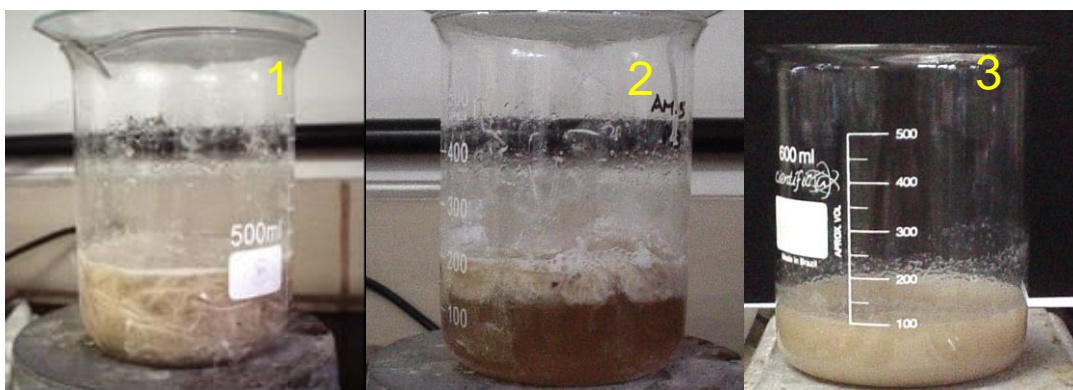


Figura 3.2 – Foto do processo de extração. 1- 1h; 2- 2h30; 3- 4h.

3.2.3 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS ANALÍTICOS

3.2.3.1 GRAU DE EXTRAÇÃO EM FUNÇÃO DO TEMPO

O grau de extração medido em função do tempo de reação seguiu o protocolo de dosagem proteica proposto por Bradford (1976). Essa metodologia baseia-se na reação do agente Coomassie Blue G-250 com a proteína. Esse grupamento liga-se principalmente aos resíduos aromáticos e resulta em uma forte absorção na faixa de 595nm. As funções de concentração proteica foram delineadas de acordo com os resultados das análises da proteína padrão, medida por Bradford.

3.2.3.2 GRAU DE FRAGMENTAÇÃO EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA

O rendimento do processo de fragmentação consistiu na fração da diferença de massa seca entre as penas utilizadas (massa inicial) com as penas retidas no filtro (massa final), e a massa de penas inicial, como pode ser descrito pela equação a seguir:

$$Fr = \{(Mi - Mf) \times 100\} \div Mi \quad \text{Eq.1}$$

A extração resultava em um subproduto dividido em duas partes: sobrenadante (penas fragmentadas) e precipitado (penas não fragmentadas). As penas não fragmentadas e o precipitado presente na suspensão eram separados por tecido de separação, e secos em estufa de ar circulante durante três dias, tempo aproximado para que a massa atingisse valores constantes, em temperatura de 80° C. Em seguida, eram avaliados a massa seca e o grau de rendimento de fragmentação, em função da temperatura. Esse material foi também macerado até a formação de grânulos de queratina, utilizado como material de partida para tratamento de efluentes.

3.2.4 ANÁLISE DA PARTÍCULA

O equipamento de difração dinâmica de luz, de modelo Coulter N4 Plus, determina o tamanho médio das partículas por meio da medida da velocidade de difusão das partículas. Esse equipamento analisa além de emulsões, partículas e moléculas em suspensão com diâmetros variando na faixa entre 3 nm e 3000 nm. Calcula, também, a distribuição de tamanhos de partículas a partir da medida do coeficiente de difusão da amostra através do PCS (Photon Correlation Spectroscopy), correlações digitais para as medidas do DLS (Dynamic Light Cattering), adequadas para amostras mono modais.



Figura 3.3 – Equipamento de difração dinâmica de luz Coulter N4 Plus

3.2.5 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

A curva de referência seguiu o preparo de solução de tirosina 5mg/ml em solução ácida de HCl 0,05M. Para cada amostra adicionou-se 5 ml de solução de ácido tricloacético 5%. A medida de atividade de tirosinase era feita por análise de sobrenadante da amostra, após centrifugação a 4000 rpm, durante 20 minutos.

O preparo das amostras de papaína ocorreu a partir de modificações do protocolo proposto por Arnon (1970). Foram realizadas 8 amostras de solução caseína 0,01g/ml e adicionou-se à solução de caseína, diferentes volumes de solução de papaína (0,1ml – 0,8 ml), em concentração de 0,05mg/ml.

A unidade de atividade enzimática é descrita pela quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1 μ mol de substrato por minuto. A atividade enzimática

da papaína sobre um substrato pode também ser definida como aquela que ocasiona a elevação, sob determinadas condições, de uma unidade de absorbância, a 280nm, por minuto. Assim, para determinação da atividade enzimática, utilizou-se a equação da curva de calibração da tirosina, considerada como referência.

3.2.6 METODOLOGIAS DE SEPARAÇÃO

3.2.6.1 DIÁLISE

A fração líquida obtida pelo processamento das penas era dialisada em membrana de diálise Sygma Aldrich *cut-off* de 10kDa, num meio contendo água destilada, com troca a cada seis horas, durante três dias consecutivos. Posteriormente, era liofilizada para avaliação da sua massa seca.

3.2.6.2 SEPARAÇÃO E ULTRAFILTRAÇÃO

Os ensaios de fração molecular por ultrafiltração foram realizados com tubos de separação Vivaspin®, com volume de 15ml. As membranas empregadas variavam o *cut-off* entre 50kDa à 10kDa. Esse procedimento de análise foi realizado por meio de algumas modificações do trabalho de Carreira et al (2003). A amostra foi preparada com uma concentração inicial de 7,5mg/ml. A solução de extrato bruto de queratina foi adicionada aos tubos de separação e centrifugadas a rotação de 6000 RPM e o material filtrado era avaliado em leitura por espectro na faixa de 280nm. A quantificação desse método somente pode ser utilizada em proteínas puras. A leitura em 280nm ocorre nos resíduos aromáticos como: triptofano, tirosina, fenilalanina e histidina.

Para medida de concentração proteica segue a fórmula:

$$c(\text{mg/ml}) = A_{280} / l(\text{cm})$$

Eq 2

3.2.6.3 AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS DE BAIXO PESO MOLECULAR

Para verificar a presença de proteínas de baixo peso molecular, procedeu-se a quantificação de proteínas através de protocolo proposto por Haag (1987), pela precipitação de proteínas de alto peso molecular por TCA. A dosagem das proteínas no sobrenadante foi realizada em leitura de absorbância na faixa de 205nm.

3.2.7 PORCENTAGEM DE PROTEÍNA NO EXTRATO BRUTO DE QUERATINA

Esse método, atualmente conhecido como Metodologia de Lowry, foi inicialmente proposto por Wu em 1922, sendo esta a metodologia mais utilizada para determinação de proteínas. O princípio do método baseia-se numa mistura contendo molibdato, tungstênio e ácido fosfórico (reagente Folin- Ciocalteau) que sofre uma redução ao reagir com proteínas, na presença do catalisador de cobre (II), produzindo um composto de absorção máxima em 750nm.

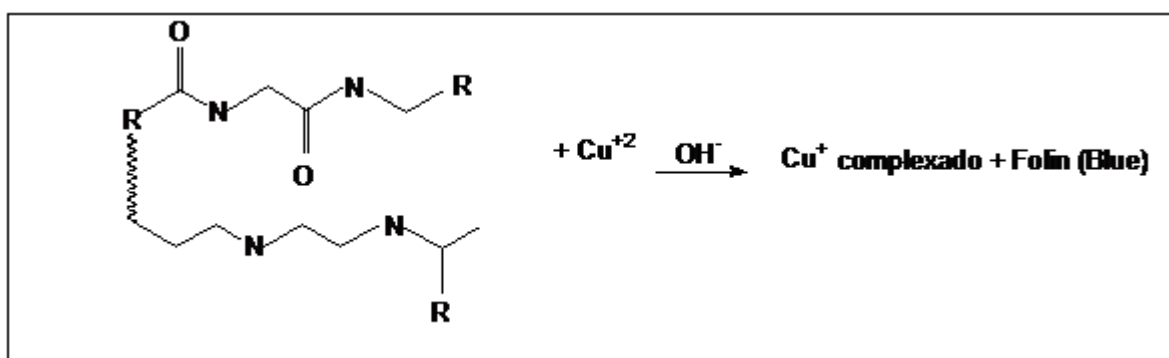


Figura 3.4 – Reação de complexação de proteínas em ensaio de dosagem proteica por Lowry.

Preparou-se uma solução aquosa a 0,1% de queratina dialisada e liofilizada. A avaliação de concentração proteica seguiu a metodologia de Lowry (LOWRY, O.H. et al. (1951).

3.2.7.1 METODOLOGIA MICRO-KJELDHAL

A metodologia de Micro-Kjeldhal, adaptado de Campbell (2001), baseia-se na transformação do nitrogênio da amostra em sulfato de amônio, através da digestão com H_2SO_4 e posterior destilação com liberação da amônia, que é fixada em solução ácida e titulada. Podem-se expressar os resultados em protídeos, multiplicando-se o % de N pelo fator de conversão específico.

A amostra de queratina estava livre de reagentes, após completa remoção por diálise e seca por liofilização. As amostras foram adicionadas em tubos de ensaio contendo ácido sulfúrico P.A. a fim de digerir completamente a proteína. Os cálculos empregados para avaliação eram:

$$\% N = \frac{V \times N \times f \times 0,0014 \times 100}{m} \quad \text{Eq.3}$$

onde,

V= volume da solução de ácido sulfúrico 0,1N gasto na titulação após correção do branco, em ml.

N= normalidade da solução ácida.

f= fator de correção da solução de ácido a 0,1N

m= massa da amostra

f= fator de conversão N/proteína, onde F= 6,25, de acordo com trabalho publicado por Fujyia, N.M., (2001) realizada em ensaios com o Queratan, queratina comercialmente utilizada.

3.2.7.2 ELETROFORESE SDS-PAGE

Pipetou-se 20µl de cada amostra e adicionou-se 5µl de *sample buffer*. Após um *spin* de 30 segundos, aplicou-se cada amostra nos poços do gel para realizar corrida em 150V, durante aproximadamente 1h30m. O gel empregado foi de 12,5% e o corante era o Coomassie Blue.

3.2.8 SÍNTESE DOS DERIVADOS DE QUERATINA

3.2.8.1 PREPARO DA SOLUÇÃO DE QUERATINA A 5%

O procedimento de preparo dos derivados da queratina foi obtido pela modificação do protocolo de Freddi; Tsukada e Shiozaki (1999). Inicialmente, preparou-se solução aquosa de queratina 5 % (p/v), em pH variando entre 8-10, sob agitação mecânica e aquecimento a 60°C, durante 35 minutos. A solução resultante foi resfriada e mantida em baixa temperatura.

3.2.8.2 SÍNTESE DA SUCCINIL-QUERATINA (QS) E DA FTALOIL-QUERATINA (QF)

Na primeira síntese, para 200g de solução de queratina a 5%, pesou-se 6g de anidrido succínico. Na segunda, para 200g de solução de queratina, pesou-se 6g de anidrido ftálico. Esses reagentes foram adicionados à solução em pequenas porções ao longo de 30 minutos, sob agitação magnética, em temperatura ambiente. As sínteses ocorreram durante 3 horas. Os produtos finais foram dialisados para total eliminação dos reagentes em excesso. Após, as amostras foram liofilizadas.

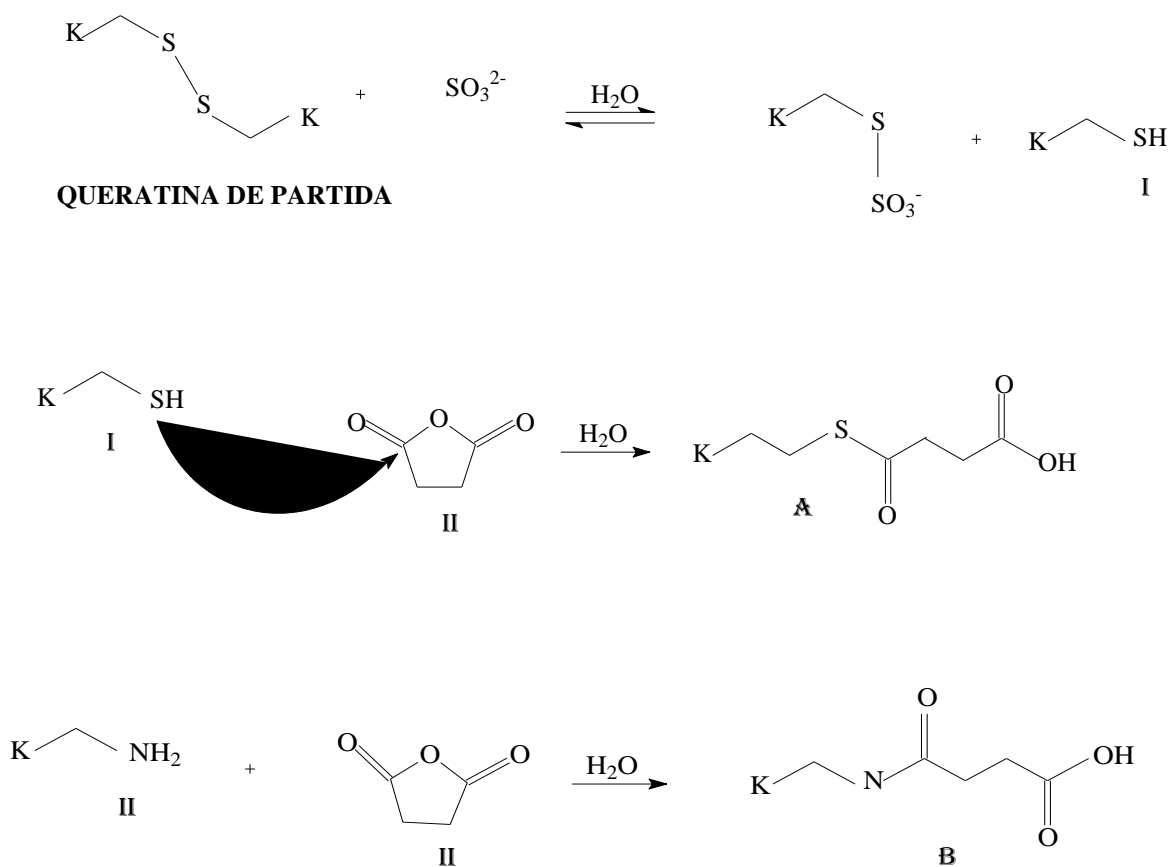


Figura 3.5 – Rota Sintética dos derivados de queratina na presença de anidrido succínico.

Na Figura 3.5, os elementos I (QUERATINA) e II (ANIDRIDO SUCCÍNICO) representam a possível rota de ataque dos anidridos e A e B são os derivados de queratina formados.

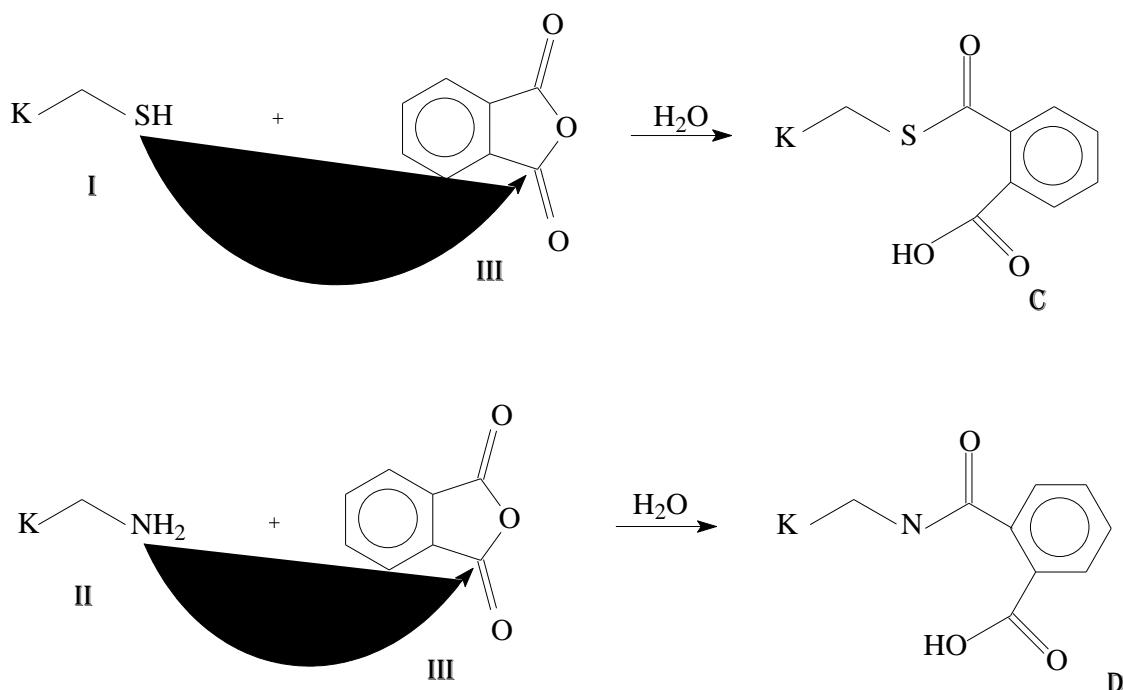


Figura 3.6 – Rota de síntese dos derivados de queratina na presença de anidrido ftálico.

A Figura 3.6 representa a possível rota de ataque de I (QUERATINA) e III (ANIDRIDO FTÁLICO) na formação dos derivados C e D.

3.2.9 ESPECTROSCOPIA RAMAN

As amostras liofilizadas eram compactadas e avaliadas em equipamento de espectroscopia Raman. A análise por espectroscopia Raman consiste numa técnica de identificação de materiais orgânicos e inorgânicos, a partir da incidência de uma luz monocromática. Essa luz, ao se dispersar no material a ser analisado, gera um fenômeno inelástico, o qual permite troca de frequências específicas, como as rotações e vibrações moleculares, promovendo informações sobre a composição química e a estrutura desse material.

O equipamento empregado foi o modelo Bruker IFS 28/N. A faixa espectral do monitoramento por Raman mede entre 100 a 4000 cm⁻¹, com resolução de 4cm⁻¹, a frequência de laser era 1064nm e power de 200mW e 1024 scans.

3.2.10 SOLUBILIDADE

Os testes de solubilidade da queratina de partida e da queratina modificada consistiram numa avaliação qualitativa, na qual se utilizaram valores idênticos de massa da proteína e de volume de solventes. A escolha dos solventes ocorreu em função de sua aplicação na composição de formulações cosméticas, considerando que o estudo da queratina no presente trabalho focou-se na sua utilização como insumo para tratamento capilar. A avaliação da solubilidade também é uma propriedade muito empregada nas indústrias de tintas, perfumes, sabões e detergentes, açúcares e plásticos.

Os solventes utilizados para essa técnica são todos de grau técnico: glicerina, propilenoglicol, álcoois, água, soluções ácidas e alcalinas e óleo mineral. Para cada avaliação, utilizou-se 1,2g em massa de queratina para 4,5ml de solvente. Controlou-se a reação de solubilidade em diferentes temperaturas, de 25°C a 50°C, com registro em fotos.

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PLANEJAMENTO FATORIAL 3X3

A concentração de sais das séries evoluiu de acordo com o planejamento fatorial 3X3, no qual as concentrações de máximo, mínimo e médios valores foram cruzados de maneira a obter 18 ensaios de extração, sendo 9 ensaios por agentes redutores (Tabela 4.1) e 9 ensaios por papaína (Tabela 4.2).

notação	-1	0	1
Na₂SO₃, mol. l⁻¹	0,1	0,18	0,27
CH₄N₂O, mol. l⁻¹	1,5	3,75	6
SÉRIE	Na₂SO₃	CH₄N₂O	
1	-1	-1	
2	-1	0	
3	-1	1	
4	0	-1	
5	0	0	
6	0	1	
7	1	-1	
8	1	0	
9	1	1	

Tabela 4.1 – Dados do experimento de extração por sulfito de sódio e ureia.

Notação	-1	0	1
Na₂SO₃, mol .l⁻¹	0,1	0,18	0,27
Papaína, mg/ml	0,13	0,2	0,26
SÉRIE	Na₂SO₃	PAPAÍNA	
1	-1	-1	
2	0	-1	
3	1	-1	
4	-1	0	
5	0	0	
6	1	0	
7	-1	1	
8	0	1	
9	1	1	

Tabela 4.2 – Dados do experimento de extração por papaína e sulfito de sódio.

4.2 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA PAPAÍNA

De acordo com Robles (1992), a atividade enzimática da papaína pode ser definida pela formação de um produto ou pelo desaparecimento do substrato na presença de enzima proteolítica.

A atuação da papaína no substrato envolve a presença de resíduos de arginina ou lisina no substrato, de grupamentos sintéticos com ligações éster, tiol-éster, peptídica e amídica. Verificou-se que os valores de ótimo de concentração de papaína para atividade enzimática coincidem com a concentração previamente determinada por Blackburn (1950), o qual utilizou 0,2 mg/ml de papaína para extração de queratina da lã. O faixa de pH empregada na reação era de 6-8.

Segue abaixo, Figura 4.1, os valores de absorbância de proteínas de baixo peso molecular, presentes na amostra de caseína. Medida realizada em comprimento de onda de 280nm.

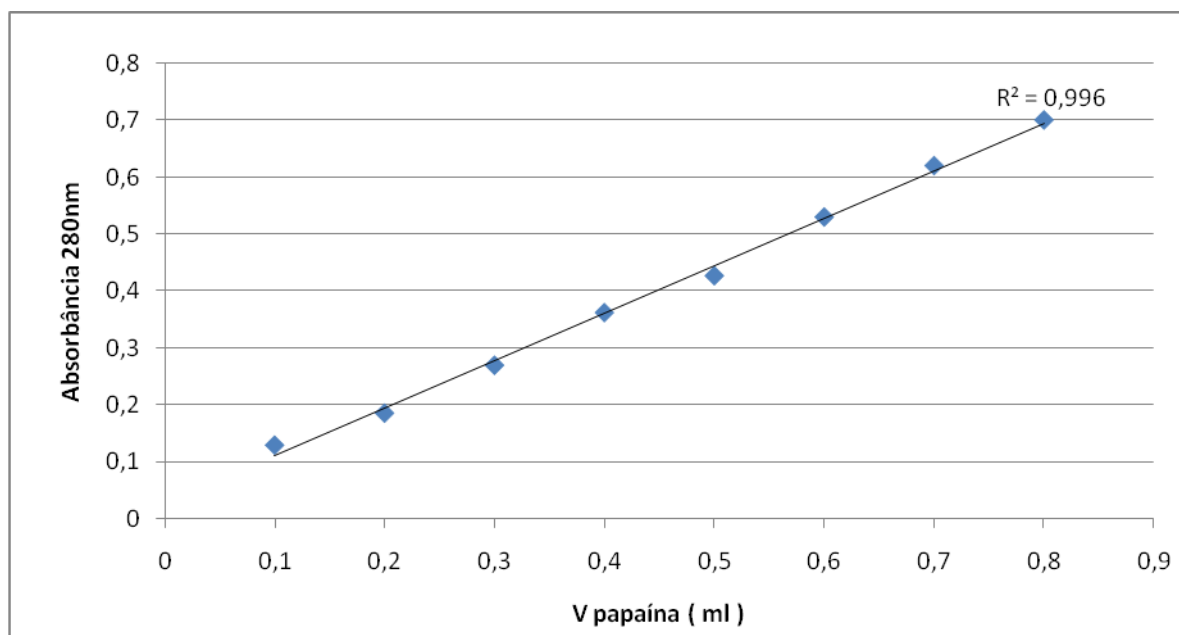


Figura 4.1 – Curva de absorbância em função do volume de solução de papaína 0,05 mg/ml.

4.3 PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO: TEMPERATURA E TEMPO

O estudo dos processos extrativos seguiu a técnica de planejamento fatorial, que utilizou diferentes concentrações de uréia e sulfito de sódio, em um primeiro protocolo e num segundo, diferentes concentrações da enzima papaína.

Esse estudo teve como objetivo avaliar o grau de extração da queratina em função da temperatura e do tempo. Após a extração química, obtinha-se um produto de coloração amarelo-escuro e moderado odor de amônia.

Observou-se, também, que os ensaios de extração química e hidrólise enzimática com maior grau de fragmentação, de acordo com a Equação 1, resultavam também em maior volume de corpo de fundo. Enquanto que os ensaios de menor fragmentação resultavam na formação de maior volume de sobrenadante.

Durante todos os ensaios de extração e hidrólise, o valor de pH manteve-se constante na faixa entre 8-9.

O tempo de reação estipulado segue uma variação de trabalhos apresentados na literatura, o qual seria suficiente para que as penas tivessem contato com o meio reacional e suas pontes dissulfeto e algumas ligações de hidrogênio fossem fragmentadas.

4.3.1 ANÁLISE DO PROCESSO DE FRAGMENTAÇÃO EM RELAÇÃO À TEMPERATURA

A temperatura de reação desse experimento manteve-se aproximadamente em 80 °C, com tempo de reação de 5 horas, para a extração química, e acima de 5 horas para hidrólise enzimática. De acordo com a equação 4, propõe-se o gráfico mostrado na Figura 4.2. Temperaturas de reação abaixo de 60°C não apresentaram valores de extração proteica satisfatórios. O grau de fragmentação para essa faixa de temperatura foi de 25% em massa fragmentada em relação à faixa de temperatura entre 70° C a 90° C.

Notam-se nos pontos referentes às séries 1, 4 e 7 um pico de baixa fragmentação. Essa queda pode estar relacionada às concentrações mínimas de ureia, as quais são ineficientes para o processo extrativo. Na série 7, a alta concentração de sulfito de sódio (0,27M), combinada à alta temperatura resultou na saturação do meio reacional, por evaporação da água. Este fenômeno explica a redução da velocidade de reação e a baixa taxa de extração de proteína nesta série.

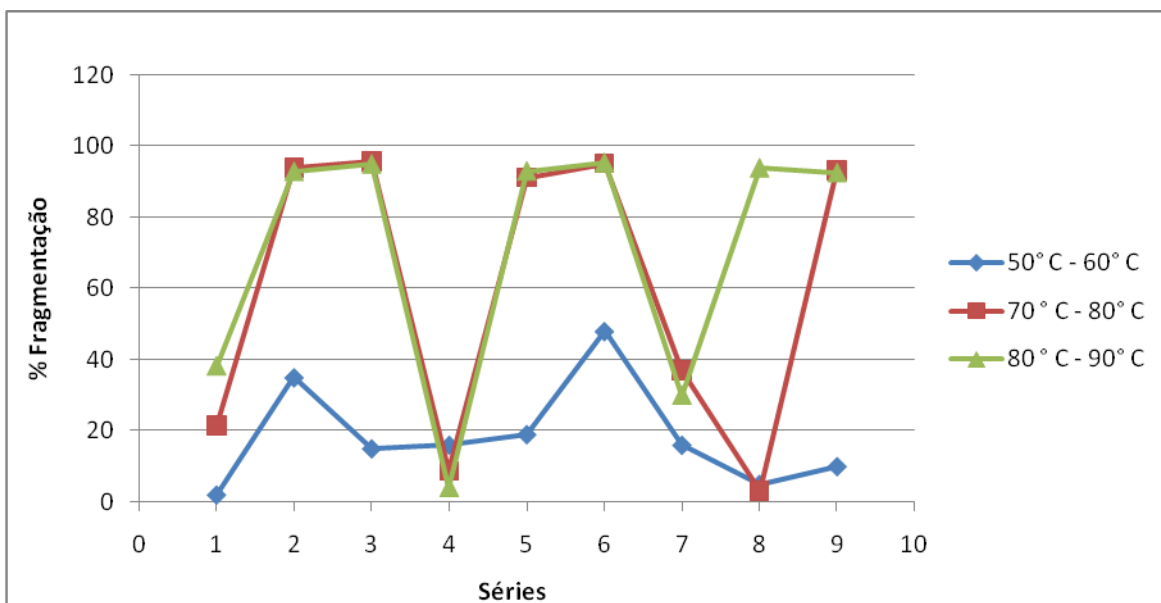


Figura 4.2 – Análise do processo de fragmentação da queratina por extração química, em função da temperatura de reação.

De acordo com trabalho publicado por Moore, R.P. et al, (2006), a temperatura ideal para extração da queratina das penas, era aproximadamente de 40°C, e com o aumento da temperatura havia decaimento no grau de extração. Contudo, no presente trabalho, observou-se que para que houvesse extração química de queratina, seria necessário empregar uma temperatura na faixa de 60° C a 80° C. Valores acima de 80° C não alteraram o grau de fragmentação das penas

4.3.2 ANÁLISE DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO EM FUNÇÃO DO TEMPO

A Figura 4.2 apresenta a concentração de proteína extraída em cada série, em função de um determinado tempo. Essa concentração foi avaliada pela metodologia de Bradford, (1976) na qual foram feitas seriadas alíquotagens do meio sobrenadante, a cada hora.

Empregou-se a proteína albumina bovina (BSA) como padrão para delineamento da curva de calibração para metodologia de dosagem proteica de Bradford.

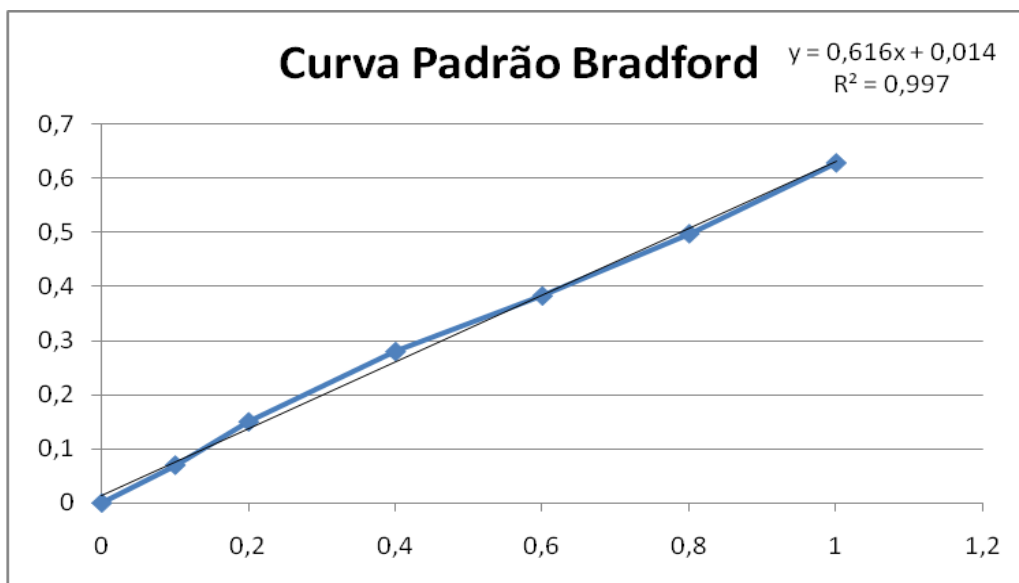


Figura 4.3 - Curva padrão de dosagem proteica por metodologia Bradford.

O grau de extração de proteína, para processo de extração química e hidrólise enzimática, durante a primeira hora de reação (60 minutos) apresentou a menor taxa de extração protéica. À medida em que aumentamos o tempo de reação, houve aumento na extração da proteína. Contudo, pela Figura 4.4 notamos que a partir de 2h30min de reação, a concentração de proteínas extraídas passa a ser constante e erros na reprodutibilidade podem estar relacionados tanto à instabilidade térmica das chapas elétricas entre um ensaio e outro como à erros do operador.

Em função da grande concentração de ureia (6M) nas séries 3, 6 e 9, pode-se inferir que a presença de ureia é fundamental para o processo extrativo. No entanto, os valores de proteína extraída nas séries 2, 5 e 8, de concentração intermediária de ureia, eram próximos aos valores de concentração obtidos nas séries 6 e 9. Tal fato demonstra que valores acima de 3,75M de ureia no processo extrativo de queratina são suficientes para obtenção da taxa máxima de extração.

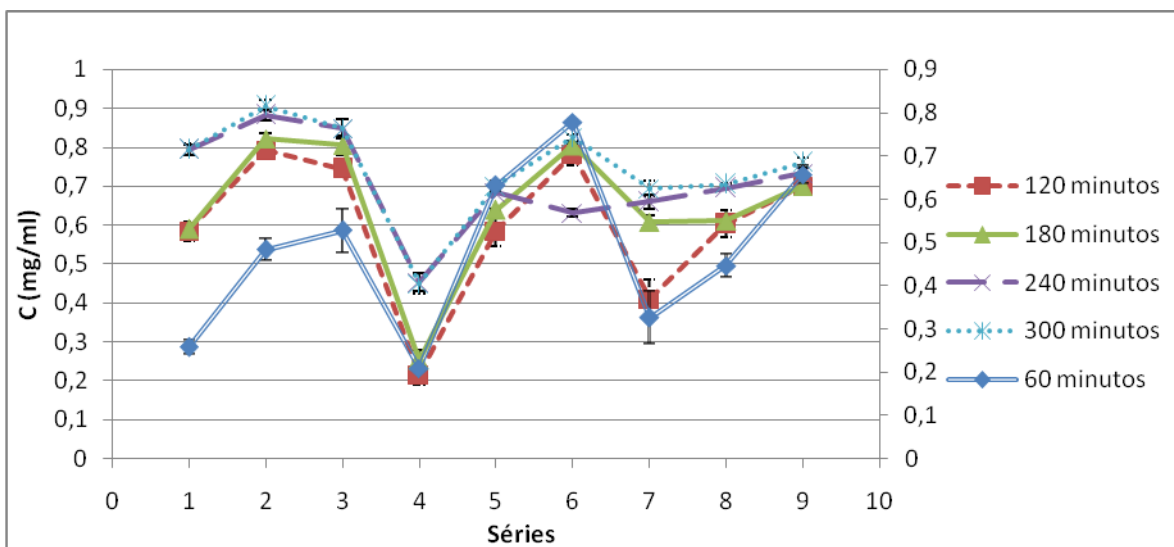


Figura 4.4 – Análise do processo de extração da queratina por diferentes concentrações de sulfito de sódio e ureia, em função do tempo de reação.

As séries 2, 3, 5, 6 e 9 foram as que apresentaram maior concentração de proteínas no tempo de 5 horas. Contudo, as séries 5 e 6 apresentaram-se mais oscilantes, isto é, para um intervalo de confiança de 95%, o desvio padrão medido era maior, se comparado às outras séries.

Sendo o grau de dissociação salina no meio reacional um fator diretamente proporcional a sua reação com os sítios de clivagem do substrato proteico, a baixa solubilidade desses sais reduz o rendimento extrativo. Por esta razão, as séries 2, 5 e 6 apresentam-se com valores muito semelhantes de extração proteica e com maior reprodutibilidade.

A série 1, que apresentou boa taxa de extração, mesmo em condições de baixa concentração de reagentes, demonstra que o aumento da concentração de sulfito de sódio, após concentração acima de 0,1M, combinado a uma baixa concentração de ureia (2M), leva ao decréscimo da extração da queratina. Mas essa concentração de sulfito de sódio combinada a valores intermediários de ureia são suficientes para obtenção de proteína das penas em tempo de reação de 5 horas.

É importante, portanto, o emprego de baixas concentrações de sulfito de sódio, (abaixo de 0,1M), e combinado com concentração intermediária de ureia (3,75M), a fim de obter um processo de extração efetivo e com economia de reagentes.

A série 3 apresentou-se mais viável, pois apresenta a menor concentração de sulfito de sódio combinada a concentração intermediária de ureia, e apresentou a maior extração de proteína, ao final do processo.

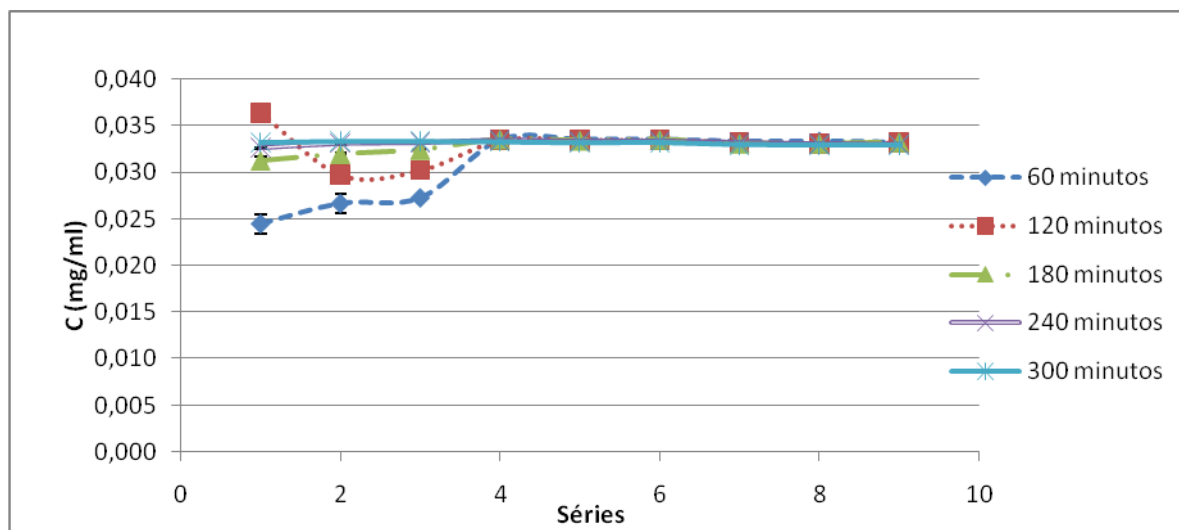


Figura 4.5 – Análise do processo de extração por diferentes concentrações de sulfito de sódio e papaína em função do tempo.

A Figura 4.5 mostra o processo de hidrólise enzimática na presença da enzima proteolítica papaína combinada a diferentes concentrações de sulfito de sódio. O ensaio visava o rendimento da extração de queratina num tempo determinado de 5 horas e temperatura fixada em 65° C, de acordo com o ótimo de atividade enzimática da papaína.

O estudo sobre a atividade proteolítica da papaína em peptídeos sintéticos demonstra que a reação de hidrólise ocorre em diferentes sítios de ligação dos substratos. De acordo com Arnon (1970), as ligações peptídicas mais susceptíveis são aquelas formadas pelos grupos carboxil dos α -aminos presentes nos resíduos da lisina e arginina e o sítio específico de reação hidrolítica situa-se no grupo carboxila presente na fenilalanina.

A reação da papaína, de acordo com resultados da análise feita por Arnon, (1970), com peptídeos de baixo peso molecular, apresenta uma grande especificidade e reage mais extensamente com substratos proteicos do que enzimas como: tripsina, pepsina ou quimotripsina, levando também a uma maior produção de aminoácidos livres. Contudo, o processo de hidrólise enzimática torna-se dispendioso se considerarmos a dificuldade do tratamento, se comparados aos processos de

sulfitólise. Enzimas geralmente são caras e muito instáveis no meio reacional, isto é, a temperatura e a concentração hidrogeniônica devem estar adequadas ao ótimo de atividade enzimática.

4.4 BALANÇO DE MASSAS

O princípio do balanço de massas respeitou a seguinte condição:

$$A1 + A2 = S + R + S2 + S3 \quad \text{Eq. 4}$$

As tabelas 4.3 e 4.4 demonstram o valor das médias das massas de penas, referentes a cada série. O rejeito constituía-se como penas de frango minimamente fragmentadas, com valor de massa seca determinada por filtração da amostra em tecidos de separação.

No presente trabalho, o termo rendimento extrativo fora empregado para exprimir a quantidade de queratina solúvel produzida, em determinado tempo de reação, para cada ensaio extrativo.

O valor de rendimento foi determinado pela fórmula a seguir:

$$Y \frac{P}{s} = (PE \div A1) \times 100 \quad \text{Eq. 5}$$

Onde,

PE = massa do sobrenadante dialisado;

A1 = massa de penas adicionada;

BALANÇO DE MASSAS (g)

SÉRIES	A 1 (g)	A 2 (g)	P 1 (g)	PE (g)	P2 (g)	R (g)
1	10	140	23,2	2,116	0,032	7,851
2	10	179,6	20,2	2,700	4,3691	2,930
3	10	193,6	18,6	2,230	5,7763	1,923
4	10	180,2	6,8	0,763	0,0901	9,146
5	10	183,6	14,2	2,782	3,7536	3,464
6	10	215	49,4	1,869	3,3771	4,753
7	10	162,8	10,6	1,604	2,0863	6,309
8	10	192,3	17,5	1,312	0,6875	8,000
9	10	209,6	29,0	1,778	0,0482	8,173

Tabela 4.3 – Balanço de massas para o protocolo de extração química.**BALANÇO DE MASSAS (g)**

SÉRIES	A1	A2	P1	PE	P2	R
1	10	154,0	21,4	0,955	6,618	2,427
2	10	155,0	5,0	1,105	6,675	2,220
3	10	156,0	12,6	1,243	3,944	4,812
4	10	155,5	30,5	1,440	1,090	7,463
5	10	156,5	46,5	0,633	0,781	8,586
6	10	157,5	52,5	1,600	0,208	8,192
7	10	157,0	7,0	0,400	1,394	8,206
8	10	158,0	20,0	0,254	0,213	9,533
9	10	159,0	10,0	0,800	0,795	8,405

Tabela 4.4 – Balanço de massas para o protocolo de hidrólise enzimática.

A1 - alimentação 1: massa de penas adicionadas

A2 - alimentação 2: massa de reagentes adicionados

P1 - perda 1: massa de reagentes e água perdidos durante o processo

PE - proteína extraída: massa do sobrenadante dialisado

P2 - perda 2: massa de proteína perdida durante processo de diálise

R - rejeito: massa de penas não-fragmentadas + massa do precipitado

SÉRIE	Y p/s
1	21,16
2	27
3	22,3
4	7,63
5	27,82
6	18,69
7	16,04
8	13,12
9	17,78

Tabela 4.5 – Rendimento de extração química da queratina.

SÉRIE	Yp/s
1	9,55
2	11,05
3	12,43
4	14,4
5	6,33
6	16
7	4
8	2,54
9	8

Tabela 4.6 – Rendimento de hidrólise enzimática da queratina.

De maneira geral, o balanço de massas mostrou baixo rendimento de produção de queratina pura (proteína extraída), seja pela extração via química, como pela hidrólise enzimática, com valores ao redor de 19% e 9,35%, respectivamente. Contudo, as séries 2, 3 e 5 do protocolo de extração via química e as séries 1 e 2 do protocolo de hidrólise enzimática apresentaram um valor de fragmentação das penas acima de 70%, sendo este resultado contraditório aos valores de rendimento de produção de proteína purificada. Essa diferença pode ser explicada pela possível perda de materiais (queratina + reagentes) devido ao processo de diálise, a qual servia para extrair do meio reacional os reagentes indesejáveis. A perda em massa de queratina chegava cerca de 70%.

Consideramos, então, que num tempo de 5 horas de reação as séries 2, 3 e 5 tiveram como grau de fragmentação, respectivamente, 70%, 80% e 60%. E as séries 1 e 2 do processo de hidrólise enzimática, em tempo de reação acima de 5 horas, grau de fragmentação era de 80%. Tal resultado classifica as séries 2, 3 e 5, do processo de extração química, e as séries 1 e 2, do protocolo de hidrólise enzimática,

como as de melhor obtenção em queratina. A massa de reagentes perdidas durante o processo era devido à alta temperatura e ao longo tempo de reação, pois durante essas reações havia certa dificuldade de controle de evaporação e, conseqüentemente, maior perda de amônia e água.

4.5 AVALIAÇÃO DO GRAU DE FRAGMENTAÇÃO COM PRÉVIO TRATAMENTO QUÍMICO E POSTERIOR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

De acordo com ALUIGI et al. (2007), o resultado da queratina extraída da lã a partir do processo de sulfitólise na presença de bissulfitos era de 30% em relação à concentração proteica original. No processo de extração da queratina das penas de frango por via química descrita no presente trabalho, o grau de fragmentação chegava a 80%, contudo, a obtenção de queratina de fração molecular entre 20kDa-70kDa, era baixa devido a impossibilidade de rompimento das ligações peptídicas pelos reagentes empregados. Assim, experimentou-se a associação de ambos os processos extrativos. Primeiramente, experimentaram-se os ensaios de extração química de maior fragmentação, com posterior hidrólise enzimática. O tempo de extração química foi reduzido em 40%, isto é, a duração da reação era de 3 horas. O tempo de reação para digestão na presença de papaína era de 2 horas. A Figura 4.6 mostra os resultados extrativos da combinação de ambos os processos extrativos.

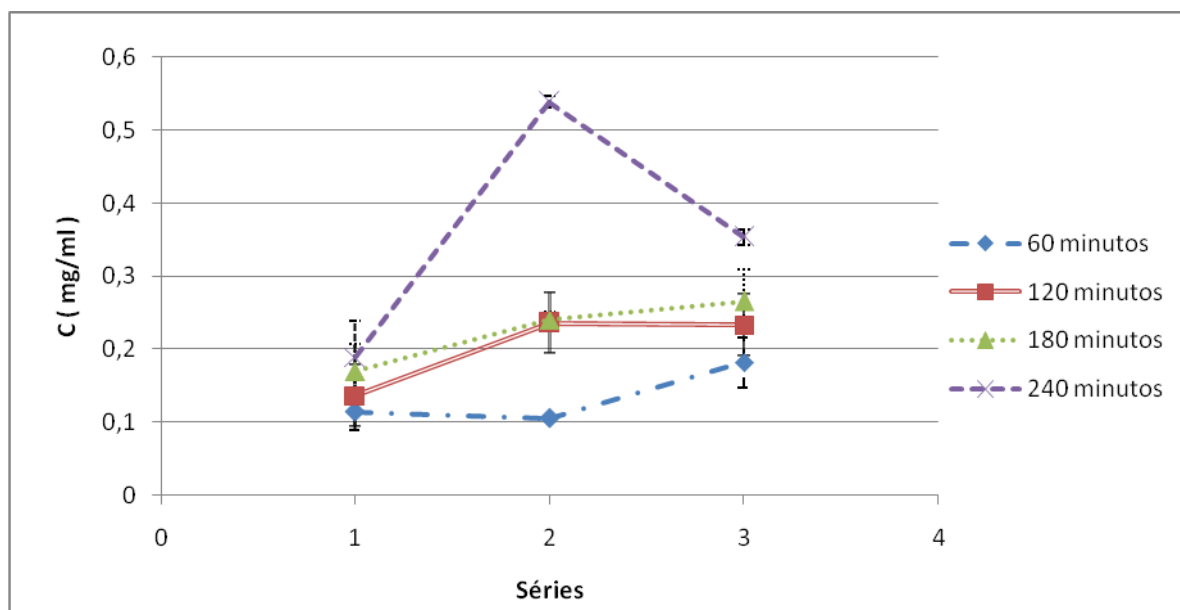


Figura 4.6 – Concentração de queratina obtida após combinação de prévia extração química e posterior hidrólise enzimática.

A união dos dois processos extrativos levava a redução no tempo de reação por extração química e proporcionava, após hidrólise enzimática, proteína com fragmentos menores e mais homogêneos.

4.6 DIÁLISE E ULTRAFILTRAÇÃO

O resultado do balanço de massas demonstrou uma perda significativa em massa de proteína. Considerando o tamanho da membrana de diálise de 10kDa, colocou-se como necessidade a avaliação desse extrato bruto em frações de massa molecular, e a adoção de método alternativo de purificação. A Tabela 4.7, mostra a distribuição de massa molecular presente na queratina, após dialise.

FRAÇÃO MÁSSICA	%
> 50 kDa	99,97
< 50 kDa e > 30kDa	0,30
< 30kDa e > 10 kDa	0,3
< 10kDa	0

Tabela 4.7 – Fração mássica do extrato bruto de queratina, processo de extração química.

FRAÇÃO MÁSSICA	%
>50 kDa	85,5%
< 50 kDa e > 30kDa	11%
< 30kDa e > 10 kDa	4,2%
< 10kDa	0,3%

Tabela 4.8 – Fração mássica do extrato bruto de queratina, processo de hidrólise enzimática

A amostra utilizada para este ensaio era proveniente da extração química, numa solução de volume igual a 100 ml. Verificou-se baixa concentração de proteínas entre as frações mássicas 50kDa e 10kDa, ao redor de 15%, para processo de hidrólise enzimática e 0,6% para extração química.

O processo de extração por hidrólise enzimática resulta em maior fragmentação de queratina, mesmo em tempo de reação igual a 5 horas.

É possível que o restante das proteínas, isto é, a fração acima de 50kDa, ficaram retidas na própria membrana de ultrafiltração, uma vez que a amostra apresenta um grupamento de proteínas de diferentes tamanhos.

4.7 RESULTADOS DAS SÍNTESES DOS DERIVADOS DE QUERATINA

As amostras de queratina modificadas foram avaliadas por leitura em espectroscopia Raman. De acordo com trabalho de Akhtar e Edwards, (1997), e Kuzuhara (2003), as regiões delimitadas pelos comprimentos de onda entre 1500 cm^{-1} e 1700 cm^{-1} contêm importantes informações sobre a presença das amidas I e II da queratina. A banda marcada pelo comprimento de 1666 cm^{-1} é característica na queratina proveniente das penas e corresponde a estrutura conformacional do tipo β -folhas como predominante. As características mais marcantes dos espectros da queratina por Raman estão na evidência dos grupamentos S-S, os quais são detectados numa região de comprimento de onda entre 500 cm^{-1} a 1000 cm^{-1} . A figura 4.5 apresenta os principais picos referentes a leitura de queratina proveniente das penas de frango.

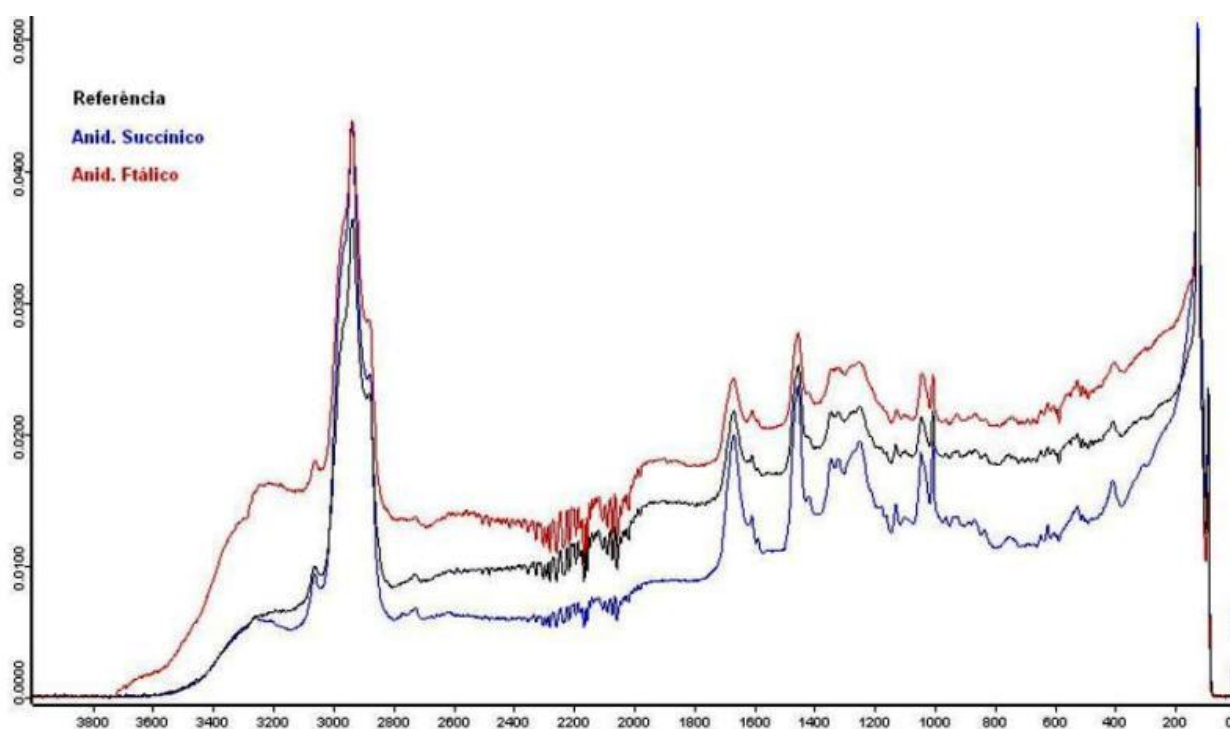
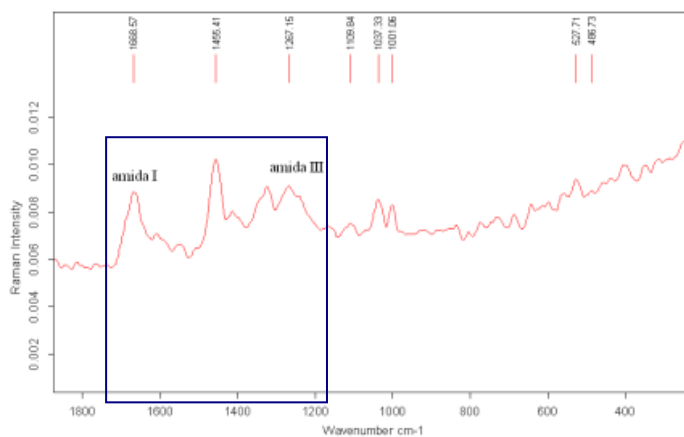


Figura 4.7 – Espectros de Raman da queratina referência Q, da queratina + anidrido succínico (QS) e queratina + anidrido ftálico (QF).

No trabalho de Kohara e Nakajima (2004), a inserção dos grupamentos anidridos na queratina ocorre pelos grupos tiólicos $-\text{SH}$, grupos amina $-\text{NH}$ e amida $-\text{CONH}$, os quais seriam os principais agentes nucleofílicos da síntese. Estes, misturados no meio reacional com anidridos, atacariam as carbonilas. Considerando

o perfil eletrônico dos grupamentos, as aminas e os grupos tióis seriam os menos impedidos para que ocorresse a reação de modificação. De acordo com a Figura 4.8, a queratina referência (a) apresenta uma intensidade maior dos picos situados entre os comprimentos de onda 1500 cm^{-1} a 1700 cm^{-1} se comparada aos picos queratina + anidrido ftálico (b). Podemos inferir então que os grupos amina e amida seriam os principais canais de inserção desses grupamentos. Contudo, não é possível especular a quantidade de queratina modificada e também avaliar as diferenças entre a queratina+ anidrido succínico e queratina + anidrido ftálico.

a)



b)

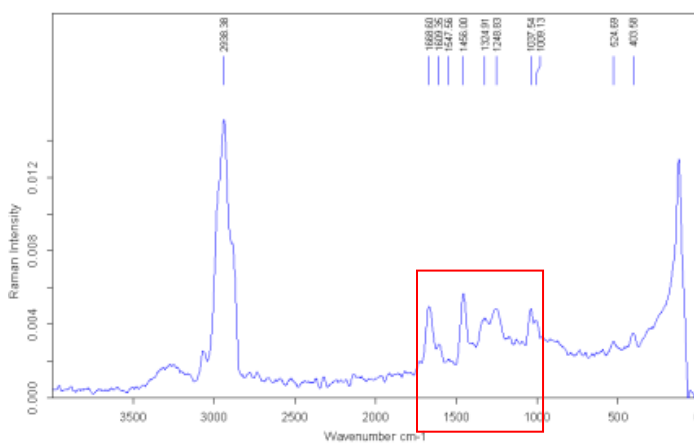


Figura 4.8 – Análise de amidas I e II, entre faixa de $1300\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$. a) Queratina Referência. b) Queratina + anidrido ftálico.

A Figura 4.9 representa os principais picos da queratina, referentes as ligações dissulfeto, presentes na cisteína e em grupos tiois regenerados. Observa-se que com as reações de modificação da queratina, não houveram alterações nas ligações dissulfeto.

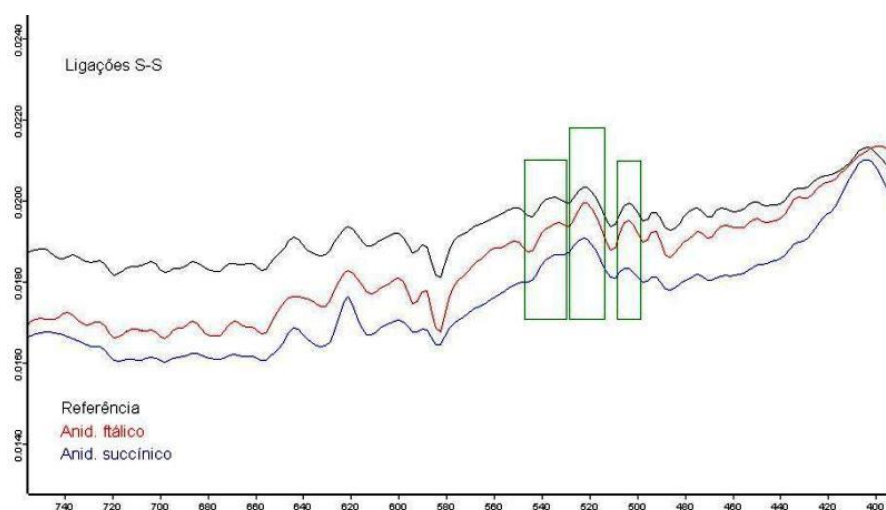


Figura 4.9 – Picos de ligação dissulfeto S-S. Potenciais picos entre $500\text{ cm}^{-1} - 558\text{ cm}^{-1}$.

4.8 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA QUERATINA

4.8.1 DOSAGEM DE PROTEÍNAS DE BAIXO PESO MOLECULAR

Após os ensaios de extração, prosseguiu-se na avaliação da concentração de proteínas de baixo peso molecular, de acordo com trabalho de Haag (1987). Para cada série de extração, mediu-se a concentração de peptídeos de cadeia abaixo de 12 aminoácidos. A medição desta dosagem foi feita em leitura na faixa de 205nm. Esta faixa do UV mede as ligações peptídicas presentes, sem alterar as características finais do produto. A medição ocorreu após centrifugação do sobrenadante tratado com TCA (ácido tricloroacético) a 5%, em 6000rpm. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

Nas figuras a seguir, mostramos a relação de concentração de proteínas de baixo peso molecular comparando-se o protocolo de extração via química (Figura 4.10) com o de hidrólise enzimática (Figura 4.11).

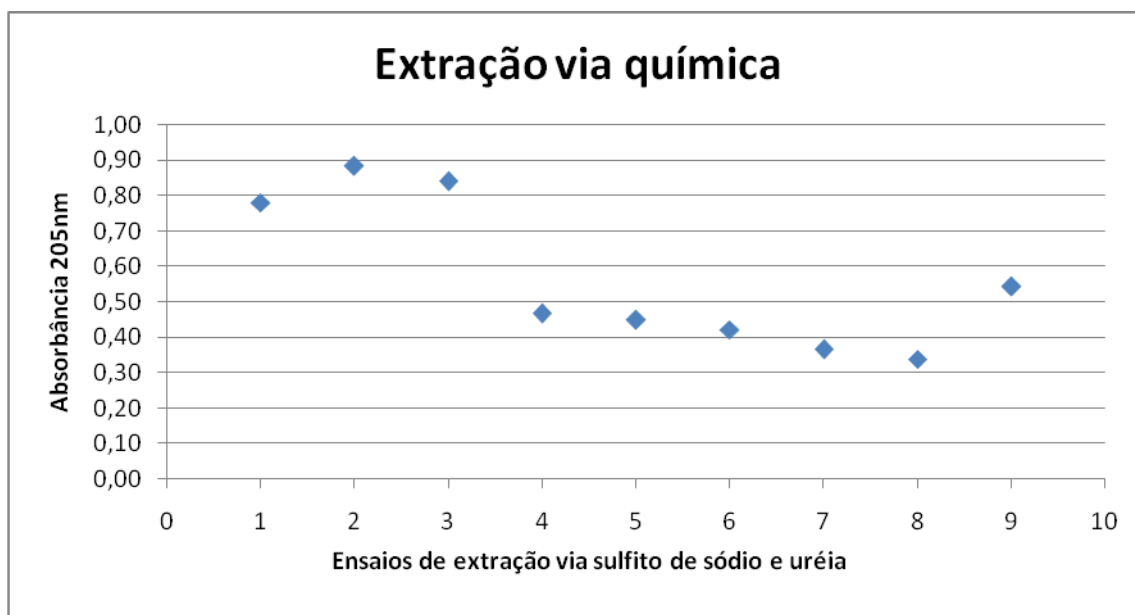


Figura 4.10- Concentração de proteínas de baixo peso molecular, nos protocolos de extração por sulfito de sódio-ureia.

O processo de extração via agentes redutores e caotrópicos, como na presença de sulfito de sódio e ureia em diferentes concentrações, levam a sulfitólise, ou seja, ao rompimento das ligações de enxofre, destruindo, portanto, as estruturas quaternárias, terciárias e secundárias. Não há na literatura nenhuma referência que defina a atividade proteolítica, isto é, o rompimento das ligações peptídicas desses compostos combinados. Portanto, é difícil supor que este processo de extração poderia resultar na hidrólise completa de proteínas. Contudo, de acordo com a Figura 4.10, podemos supor que este protocolo gera uma pequena porção de proteínas de baixo peso molecular.

Observamos que nas séries de 4-9, há menor concentração de proteínas. Tal subestimação pode estar associada à redução da velocidade de extração, ocasionada pela saturação do meio reacional, com o aumento de concentração salina.

A figura 4.10 mostra que o meio em presença de grandes concentrações de sais, como os representados pelas séries 8, 9 e 10, não produz baixo peso molecular. Descarta também a interferência da leitura em 205nm, na presença de altas concentrações de reagentes.

Podemos afirmar que as séries 1, 2 e 3 apresentaram a maior taxa de produção de proteínas de baixo peso molecular.

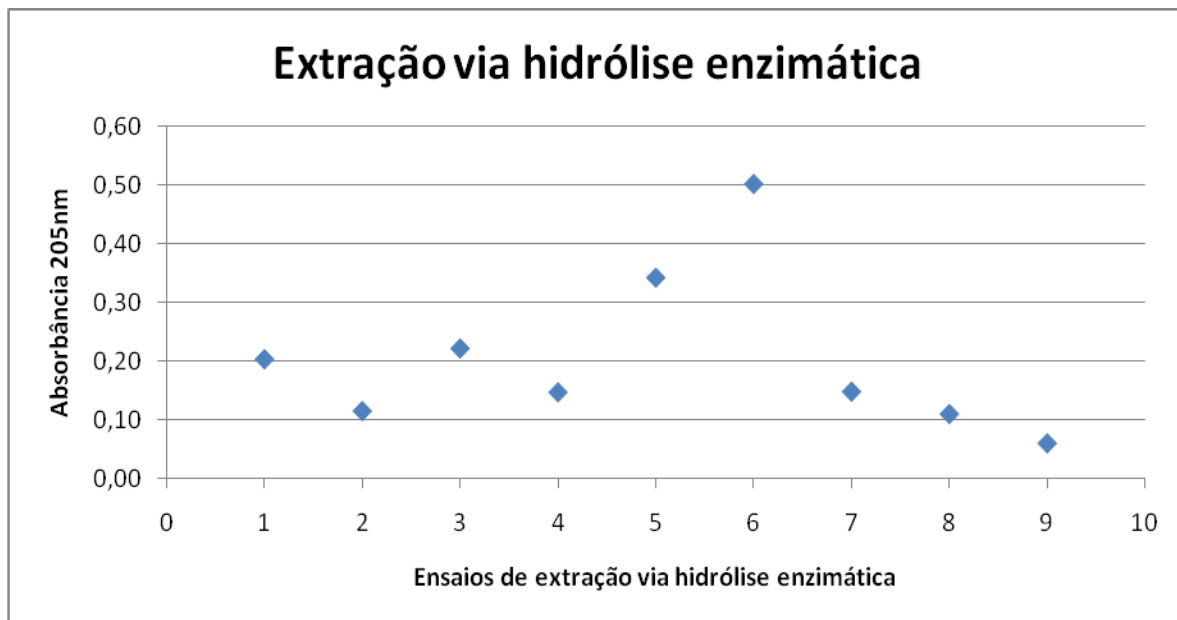


Figura 4.11- Concentração de proteínas de baixo peso molecular, nos protocolos de extração por sulfito de sódio-papaína.

A ação da enzima papaína como agente proteolítico, diretamente sob o substrato de penas de frango, resulta em menor grau de fragmentação. Como a reação proteolítica da papaína relaciona-se com a clivagem dos sítios hidrofóbicos, a interação da enzima com os sítios de clivagem das penas de frango não tratada, torna-se difícil pelo enovelamento da proteína ocasionada pelas pontes dissulfeto.

Pode-se notar também que o tempo de reação enzimática é muito maior se comparado ao processo de hidrólise ácida, alcalina ou por ação de agentes redutores. Portanto, para 5 horas de reação, a presença de proteínas de baixo molecular no ensaio contendo papaína é menor, se comparado ao ensaio contendo sulfito de sódio e ureia.

4.8.2 ANÁLISE DO TAMANHO DOS FRAGMENTOS

Trabalhos publicados mostram que a extração de queratina ocorre somente em concentrações de ureia acima de 6M. No presente trabalho demonstrou-se que em concentrações de ureia abaixo de 6M e combinadas com sulfito de sódio podem resultar em uma fragmentação das penas e também na extração da queratina. Assim,

de acordo com análise dos tamanhos dos fragmentos produzidos em cada processo extrativo, obteve-se a Figura 4.12, Figura 4.13 e Figura 4.14.

O produto resultante do processo de extração química fornece 35% da proteína variando entre 31,6 – 71nm, e o restante dos 75%, acima de 1000nm, como demonstrado na Figura 4.12. O tempo de extração química era de 5 horas.

Na figura 4.13 pode-se verificar a homogeneidade da hidrólise enzimática por papaína com 98% dos fragmentos na ordem de tamanho de 115 -421nm. O tempo de reação para atingir tal resultado era de 48 horas.

O protocolo de extração na presença de papaína demonstra a presença de menores concentrações de proteínas de baixo peso molecular, se comparado ao protocolo de extração química, como mostrado na Figura 4.12.

A combinação de ambos os processos extrativos, como mostrado na Figura 4.14, resultou em fragmentos variando entre 200nm e 650nm. Como o tempo de cada reação neste procedimento era de 2 horas para extração química e 3 horas para hidrólise enzimática, podemos afirmar que diante do resultado apresentado pela hidrólise enzimática, o aumento do tempo da reação de hidrólise enzimática resultaria também em maior quantidade de fragmentos de menor tamanho.

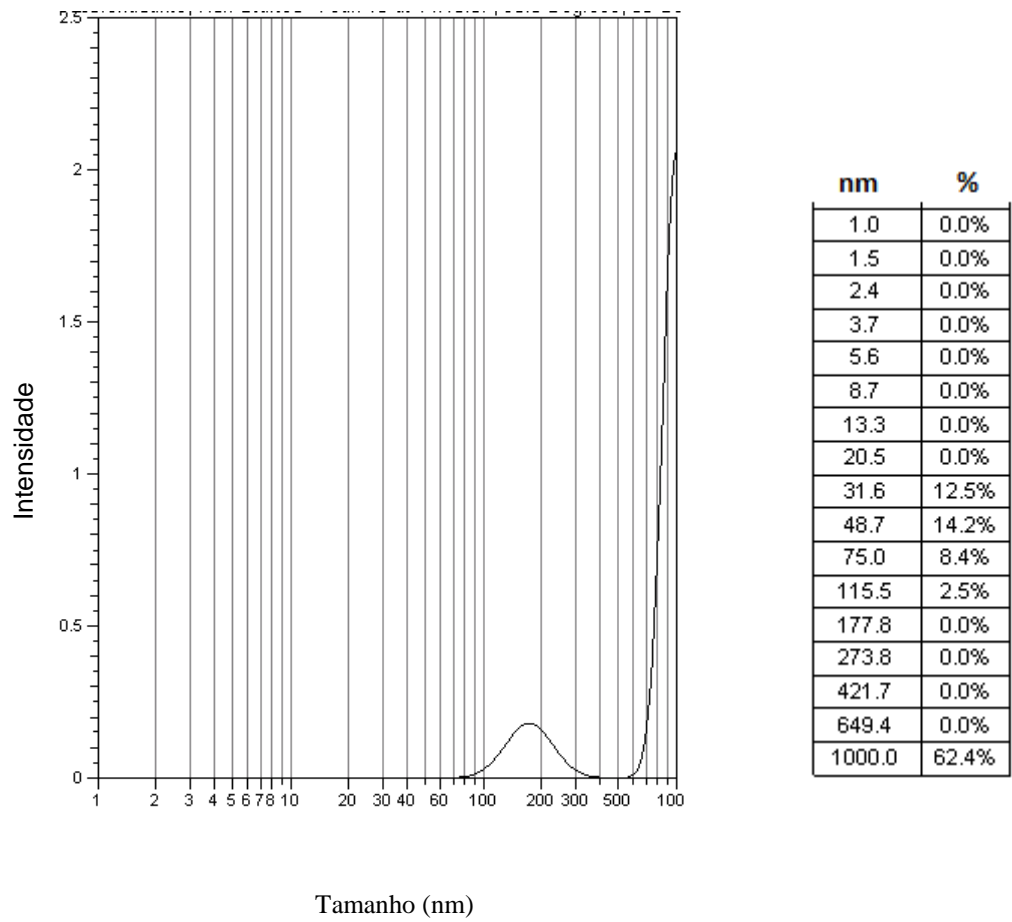


Figura 4.12- Tamanho de partícula. Extração por sulfito de sódio e ureia.

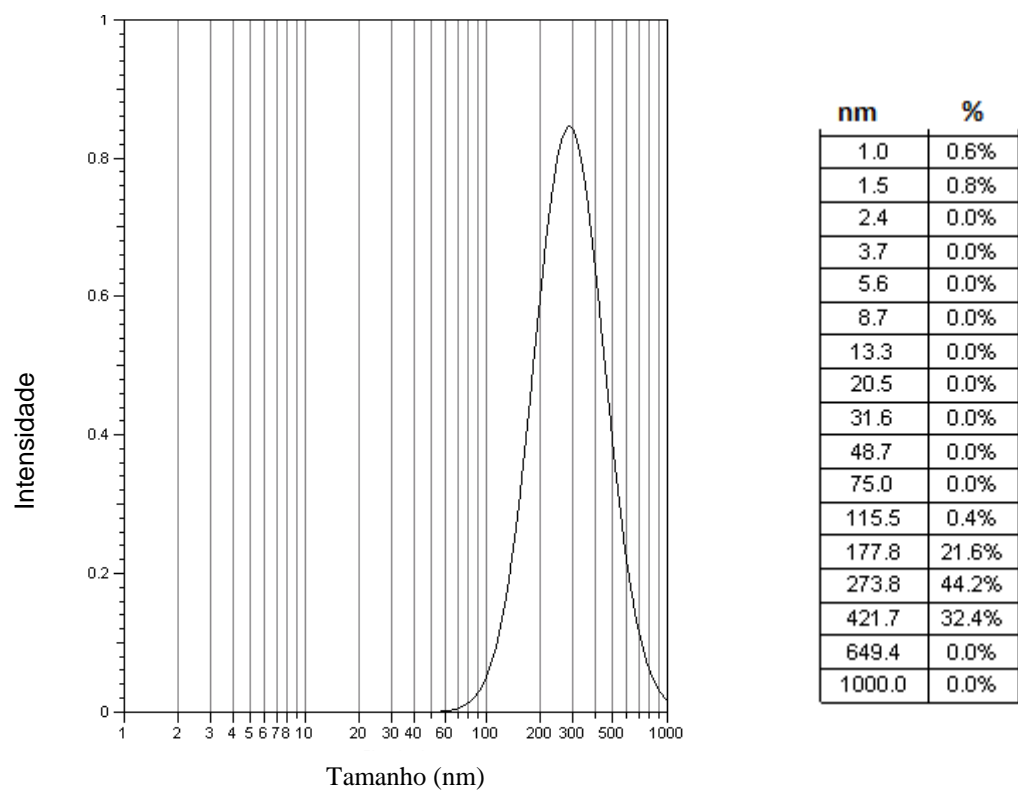


Figura 4.13 – Tamanho de partícula . Extração por hidrólise enzimática.

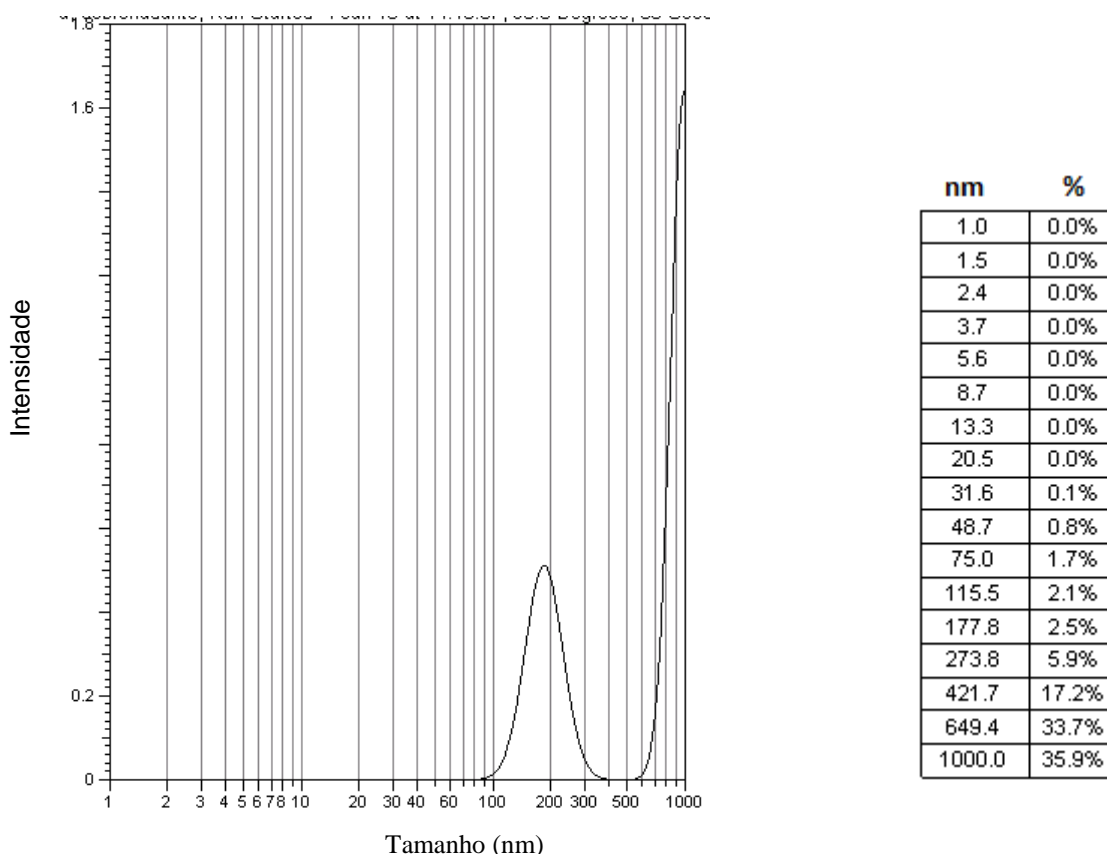


Figura 4.14 – Tamanho de partícula por combinação da extração química e hidrólise enzimática.

4.8.3 DOSAGEM PROTEICA DO EXTRATO DE QUERATINA

A caracterização físico-química da queratina restringe-se a poucas análises quantitativas, sendo que as avaliações qualitativas apresentam-se mais adequadas. Este fato pode ser devido ao caráter insolúvel da queratina em quase todos os solventes.

A análise da fração sobrenadante do extrato de penas de frango foi realizada a partir do ensaio de dosagem proteica de Lowry (1951). Este método apesar de apresentar grande sensibilidade para proteínas (0,01-1,5mg/ml) também apresenta a desvantagem de estar sujeito a muitos interferentes. No caso do meio reacional utilizado para extração da queratina, todos os reagentes presentes tinham interferência com o reagente de Folin nas concentrações em que se apresentavam. Para este ensaio, portanto, utilizou-se a queratina purificada (dialisada) e liofilizada. Preparou-se diferentes soluções desse extrato e procedeu-se a leitura da mistura na faixa de 750nm.

O padrão empregado foi albumina bovina (BSA) da Sygma-Aldrich, de acordo com Figura 4.15. O resultado dessa leitura demonstrou que a concentração de proteína presente na fração sobrenadante do extrato bruto de penas de frango está na faixa de 75%-89% em relação a sua massa total. Pode-se também concluir que essa fração proteica é quase que totalmente constituída de queratina, confirmando o resultado apresentado pela literatura.

Contudo, as análises realizadas por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida de 12,5% apresentou resultados insatisfatórios à medida em que se adicionou pequena porção da amostra de queratina em tubos Eppendorf ® e a queratina pareceu ter aderido na parede deste recipiente, não se misturando aos reagentes do ensaio e também não sendo possível a sua aplicação no gel.

Segundo IRIDAG, Y; KASANCI, M.(2005), a queratina apresenta peso molecular ao redor de 40kDa. Contudo, o gel obtido em ensaio preliminar apresentou forte coração durante toda a corrida e grande concentração de proteínas em fase estacionária, caracterizando a presença de um *pool* de fragmentos moleculares, indistinguíveis nesta análise. Aparentemente, visualizou-se forte coloração em banda ao redor de 47kDa, mas esta não é uma afirmação válida.

É importante salientar também que os processos de extração da queratina podem apresentar desde proteínas de baixo peso molecular, como grandes fragmentos de penas ainda não desintegradas.

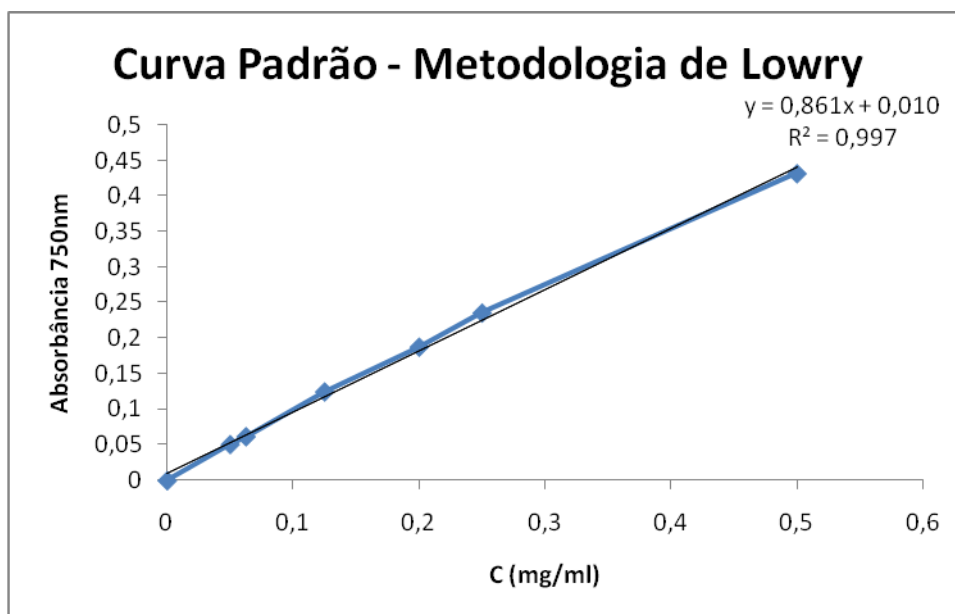


Figura 4.15 – Curva padrão de BSA- albumina bovina para metodologia de Lowry.

C aparente/C medida	BSA	Queratina Dialisada
C aparente (mg/ml)	0,2	0,2
C medida (mg/ml)	0,188	0,173

Tabela 4.9- Avaliação da concentração protéica no extrato bruto de queratina

A dosagem protéica por metodologia de Lowry é mais sensível se comparada às outras análises, isto é, para meio contendo concentrações mínimas de proteína, abaixo de 10µg/ml. Contudo, o reagente de Folin-Ciocalte apresenta forte interferência com reagentes redutores e a diferentes tampões de amostra. Dessa forma, a queratina bruta foi dialisada e posteriormente liofilizada. Ver figura 4.16.

Utilizou-se para este ensaio, um padrão de comparação com a albumina bovina BSA, em concentração inicial igual a 0,2mg/ml. Mediu-se uma concentração de extrato bruto de queratina liofilizada. Este resultado é demonstrado na Tabela 4.9. Após teste colorimétrico e medida de absorbância em comprimento de onda de 750nm, encontra-se valor de concentração de BSA ao redor de 0,18mg/ml e da massa de queratina, valor ao redor de 0,17mg/ml.

Outra análise conduzida para dosagem protéica de proteínas foi micro-Kjeldhal. O extrato 1 representa o produto obtido pelo processo envolvendo sulfito de sódio/uréia, e o extrato 2 é o obtido pelo hidrólise enzimática por papaína. O fator

de conversão usado era de 6,25, descrito na literatura para análise de colágeno e proteínas da seda. O resultado final segue a seguir:

AMOSTRAS	% N	% PROTEÍNAS
EXTRATO 1	13,5 ± 0,05	84,26
EXTRATO 2	9,7 ± 0,01	61,15

Tabela 4.10- Quantificação de N total e proteínas nas amostras de extrato bruto do sobrenadante.



Figura 4.16- Queratina solúvel e liofilizada.

4.8.4 SOLUBILIDADE

De acordo com Cooper. (1970), uma forma de se determinar a solubilidade de macromoléculas é pelo método de ‘tentativa-erro’.

Nesse ensaio de solubilidade, a queratina bruta apresenta-se insolúvel em quase todos os solventes. Contudo, em temperatura de 25°C, a queratina apresentou-se solúvel em meio contendo água e em meio alcalino. A Figura 4.11 mostra o resultado desse ensaio.

A solubilidade consiste na miscibilidade dos compostos de mesma polaridade, isto é, ‘semelhante dissolve semelhante’. Porém, há na literatura outros parâmetros a serem considerados como: densidade de energia de coesão e a entalpia de ligação. A partir desses conceitos, pode-se explicar como a queratina, em

temperatura de 25°C, apresenta-se insolúvel em alguns solventes e, após aquecimento a 50°C, o fator de solubilidade se altera. Ver em Tabela 4.12.

Outra observação importante é a insolubilidade da queratina em meio ácido. A partir dessa situação, e considerando a sua total solubilidade em meios alcalinos, é possível inferir que o ponto isoelétrico dessa proteína pode estar numa faixa de pH 4. A solubilidade parcial da queratina em meio contendo glicerina torna esta proteína uma matéria-prima interessante para formulação de produtos para pele, como sabonetes, loções hidratantes, entre outros.

GRAU DE SOLUBILIDADE APARENTE QUERATINA NÃO-MODIFICADA			
Solventes	Temperatura		
	25° C		50°C
ÁGUA	(+++)		(+++)
ÁGUA pH 2	(+)		(++)
ÁGUA pH13	(+++)		(+++)
ÁLCOOL ETÍLICO	(+)		(+)
GLICERINA	(+++)		(+++)
PROPILENOGLICOL	(+)		(++)
ÓLEO MINERAL	(-)		(-)

Tabela 4.11- Análise comparativa do grau de solubilidade aparente da queratina não-modificada.

GRAU DE SOLUBILIDADE APARENTE QUERATINA MODIFICADA		
Solventes	ANIDRIDO SUCCÍNICO	ANIDRIDO FTÁLICO
	ÁGUA	(++)
ÁGUA pH 2	(+++)	(+++)
ÁGUA pH13	(++)	(+)
ÁLCOOL ETÍLICO	(+++)	(+++)
GLICERINA	(+++)	(+++)
PROPILENOGLICOL	(++)	(+++)
ÓLEO MINERAL	(+)	(+)

Tabela 4.12- Análise comparativa do grau de solubilidade aparente da queratina modificada.

(+++)	MUITA
(++)	MÉDIA
(+)	POUCA
(-)	NENHUMA

A análise comparativa da queratina e seus derivados conjugados com anidridos succínicos e ftálicos pode ser demonstrada pelas figuras abaixo. Pode-se observar que a inserção dos grupamentos anidridos levou a alteração na

solubilidade da queratina. De acordo com a Figura 4.19, a inserção dos anidridos succínicos levou ao aumento da solubilidade da queratina em meio aquoso, ácido e etanólico. Já a queratina modificada com anidrido ftálico resultou em maior solubilidade em meio contendo álcool, propilenoglicol e óleo mineral. Esse aumento de solubilidade corresponde à inserção de componente apolar, como o anel aromático presente no anidrido ftálico. Contraditoriamente, a queratina com anidrido ftálico, Figura 4.20, apresentou também aumento da solubilidade em meio aquoso. Tal fato pode se relacionar com a polaridade da molécula de queratina, após reações de modificação, como mostrado no modelo de reação de síntese (Figura 3.5 e Figura 3.6).

Outro fator que pode interferir no aumento da solubilidade consiste não possível processo de hidrólise total da queratina durante ensaio de modificação com anidridos, resultando na formação de aminoácidos de queratina. Tal hipótese pode ser justificada pelos resultados apresentados na análise de SDS-PAGE, no qual a amostra de queratina modificada com anidrido ftálico não formou bandas, mas a amostra de anidrido succínico mostrou sutil banda em região de 14kDa.

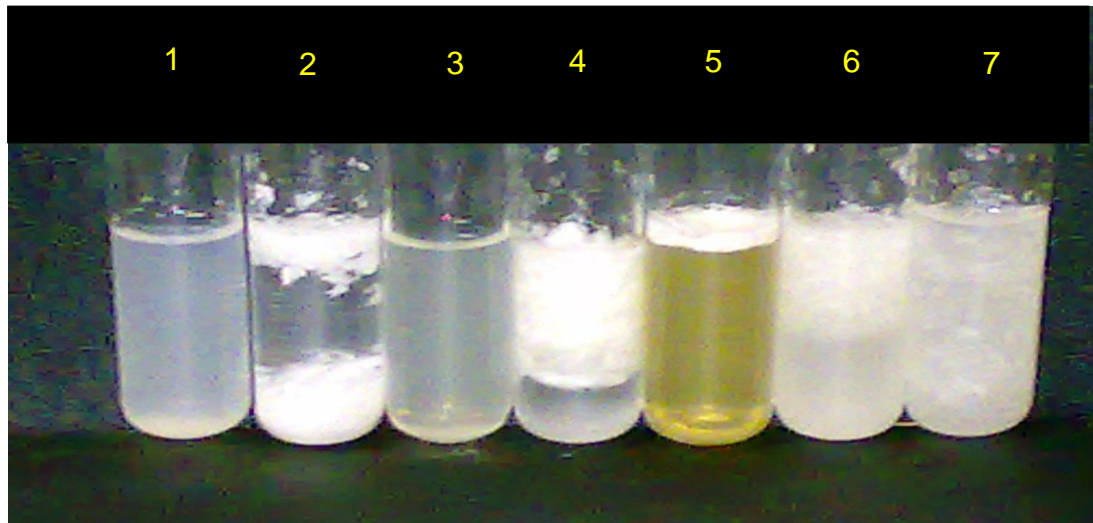


Figura 4.17 – Teste qualitativo de solubilidade em solventes diversos da queratina não modificada, em temperatura de 25°C.

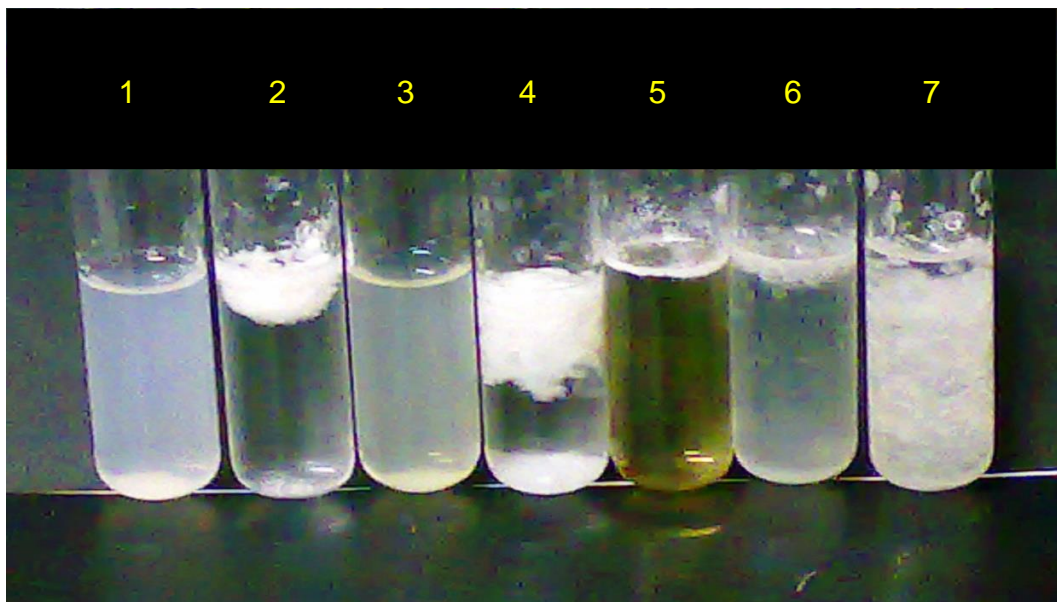


Figura 4.18 – Teste qualitativo de solubilidade em solventes diversos da queratina não modificada, em temperatura de 50°C.

1. ÁGUA, 2- pH 2; 3- pH 13; 4-ÁLCOOL ETÍLICO; 5- GLICERINA; 6- PROPILENOGLICOL; 7- ÓLEO MINERAL

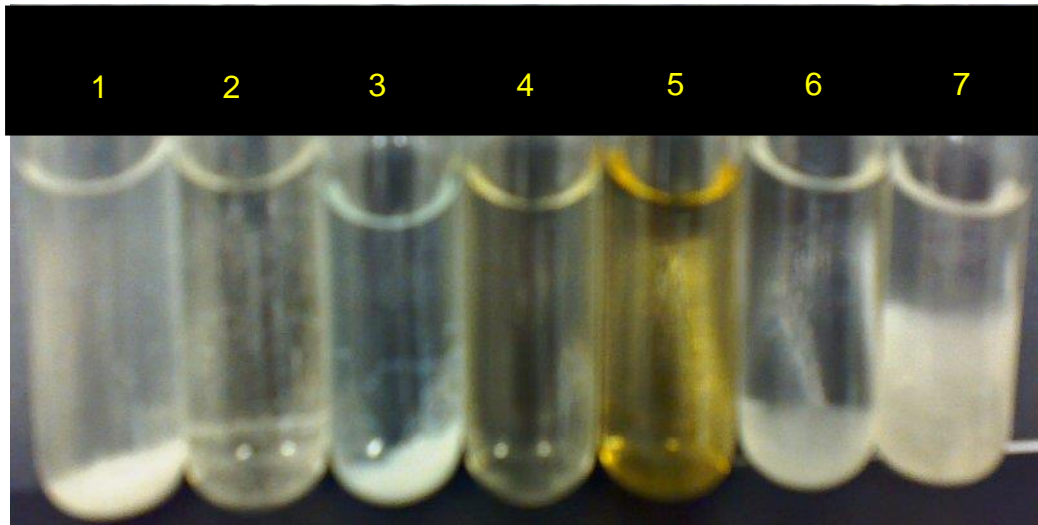


Figura 4.19 – Teste qualitativo de solubilidade em solventes diversos da queratina + anidrido succínico, em temperatura de 25°C.

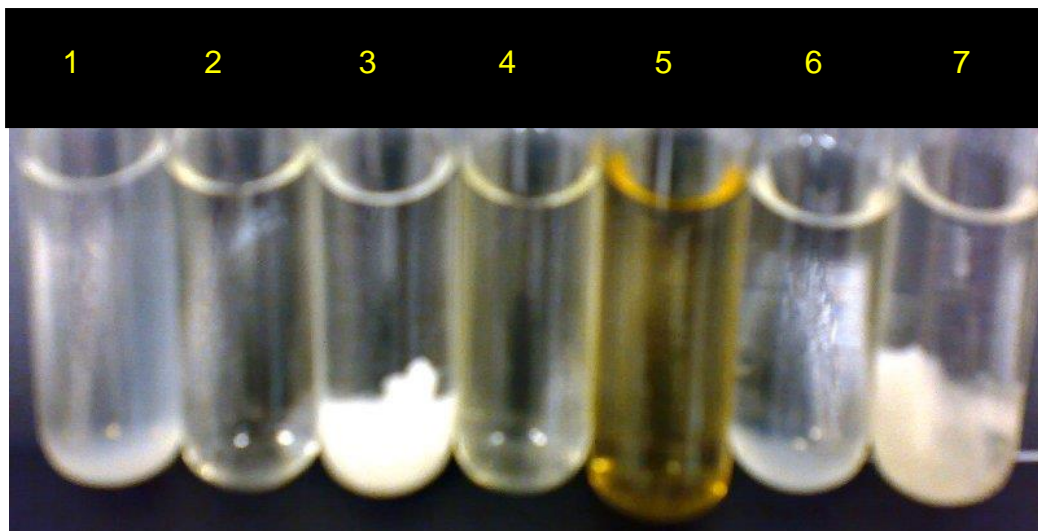


Figura 4.20 – Teste qualitativo de solubilidade em solventes diversos da queratina + anidrido ftálico, em temperatura de 25°C.

1. ÁGUA, 2- pH 2; 3- pH 13; 4-ÁLCOOL ETÍLICO; 5- GLICERINA; 6- PROPILENOGLICOL; 7- ÓLEO MINERAL

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÃO

5.1 CONCLUSÃO

No presente trabalho demonstrou-se que em concentrações de uréia abaixo de 6M e combinadas com baixas concentrações de sulfito de sódio resultam em fragmentação das penas e também na extração da queratina.

Os processos extrativos da queratina que se apresentaram mais vantajosos são os obtidos pelas séries de planejamento fatorial 2, 3 e 5, de concentração intermediária e mínima de uréia e sulfito de sódio, respectivamente. Estes oferecem o maior grau de fragmentação de penas, com o menor tempo e as menores concentrações de reagentes. Contudo, a taxa de extração de queratina de baixo peso molecular não era significativa, e a fração homogênea de peptídeos era pequena. Para tanto, fez-se necessário a combinação de dois processos de extração: via químico e via hidrólise enzimática.

Provou-se também que o emprego da hidrólise enzimática após prévio tratamento com agentes redutores, obteve-se um aumento da exposição dos sítios de clivagem queratina com a papaína e a produção de queratina com fragmentos menores e mais homogêneos.

A massa molecular de porção da queratina obtida após ambos os tratamentos acredita estar próximo de 40kDa, contudo a maior parte da proteína obtida por este processo extrativo, ainda encontra-se em faixa de peso molecular acima deste valor, entre 50kDa - 100kDa.

O tamanho médio da queratina apresentava-se ao redor de 650nm, portanto, mais adequada para o seu emprego como insumo para formulação de cosméticos e alimentos.

A principal vantagem apresentada pela união desses dois procedimentos extrativos consistiu na redução do tempo de reação, e na economia de reagentes utilizados para a produção de queratina.

Comprovou-se que para otimização da extração de queratina de baixo peso molecular, não é necessário o emprego de altas concentrações de reagentes, sendo que a concentração limite empregada para uréia é igual a 3,75M e para o sulfito de sódio igual a 0,1M.

Os derivados de queratina, obtidos pela conjugação com anidridos, apresentam-se mais solúveis em meio contendo álcool, óleo e faixa de pH ao redor de 13.

A partir da análise de Raman verificou-se diferença entre a intensidade dos picos de queratina referência e queratina + anidridos. Contudo, não houve variação entre a intensidade dos picos de queratina + anidrido ftálico e queratina + anidrido succínico. A diferença entre os dois derivados da queratina somente pode ser avaliada qualitativamente, por teste de solubilidade.

Este pode ser um fator positivo para adequação da queratina na formulação de emulsões do tipo água-óleo.

A queratina proveniente das penas de frango, como exposto no presente trabalho pode ser uma excelente proposta para obtenção de insumos classificados como sustentáveis, não somente pelo beneficiamento que o uso de resíduos de penas, mas também pelo seu processo produtivo resultar em economia de reagentes e, conseqüente redução de resíduos ao meio.

5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para os processos de extração de queratina das penas, fazem-se necessários mais ensaios empregando diferentes enzimas, combinadas ao prévio tratamento químico.

No campo da aplicação da queratina, além da sua utilização como insumo para tratamento capilar, colocam-se como perspectivas futuras, a sua utilização como biofilmes de queratina associados a outros polímeros e biopolímero com aplicações para: biomembranas para reconstituição epidérmica, biofilmes para recobrimento de alimentos e biomateriais para uso médico. Outra aplicação, em fase crescente de pesquisa é a utilização da biomassa de queratina como meio de cultura de bactérias queratinolíticas.

CAPÍTULO 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6.1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER-NISSEN, J. *Enzimic hydrolysis of food proteins*. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1986.427p.

AKHTAR, W.; EDWARDS, H.G.M., *Fourier-transform Raman spectroscopy of mammalian and avian keratotic biopolymers*. *Spectrochimica Acta Part A*, v. 53, p. 81-90, 1997.

ALEMDAR, A. IRIDAG, Y. KASANCI, M. *Flow behavior of regenerated wool-keratin proteins in different mediums*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.35, p. 151-153, 2005.

ALUIGI, A.; ZOCCOLA, M.; VINEIS, C.; TONIN, C.; FERRERO, F.; CANETTI, M. *Study on the structure and properties of wool keratin regenerated from formic acid*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 41, p. 266–273, 2007.

ARNON, R. *Papain*. In: PERLMANN, G., LORAND, L. *Methods of Enzimology*. Nova Iorque: Academic Press, 1970. cap. 14, p. 226-244.

BARONE, J.R.; SCHMIDT, W. F.; GREGOIRE, N. T. *Extrusion of Feather Keratin*. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 100, p.1432-1442, 2006.

_____. *Effect of formic acid exposure on keratin fiber derived from poultry feather biomass*. *Bioresource Technology*, v.97,n.2,p.233-242, 2006.

BENDIT, E.G.; FEUGHELMAN, M. *Encyclopedia of polymer science and technology. Plastics, resins, rubbers, fibers*. New York: Ed. John Wiley & Sons, v. 8, p.3511-3523, 1996.

BLACKBURN, S. *Products of the hydrolysis of wool keratin by papain*. *Nature*, v. 165, 1950.

BRADFORD, M.M. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry, v. 72, p. 248-254, 1976.

BROOKS, G.J. *Keratin in cosmetics*. Drug & Cosmetic Industry, v.133, p.38, 1983.

CABRAL, A. *Movimentos sociais, as ONGs e a militância que pensa, logo existe*. Disponível em: <<http://www.comunicacao.pro.br/artcon/movsocong.htm/>> .Acesso: 30 mai. 2009.

CAVALCANTI, C. *Desenvolvimento e Natureza: Estudos para uma sociedade sustentável*. Recife: Cortez, 1994..

CAMPBELL, H. *Committee on feeds, fertilizers, and related agricultural topics*. Journal of AOAC International.v. 84, n.1, 2001.

CARREIRA, R.L.;ORNELLAS, C.B.D.; MORAIS, H.A.; MOTTA, S; SILVESTRE, M.P.C. Efeito da precipitação pelo ácido tricloroacético (TCA) e da ultrafiltração sobre o perfil peptídico de hidrolisados de caseína. *Ciência Agrotecnológica*, n. 2, p. 414-421, 2003.

CETESB, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Inventário de Resíduos Industriais,1996. Disponível em: <www.cetesb.sp.gov.br/Solo/residuos/industriais.asp>. Acesso em: 20 jun. 2009.

CHU, P.K.; LIU, X. *Biomaterials Fabrication and Processing*. ed. CRC Press, 2008. 340p.

COPELAND, R.A. *Methods for protein analysis: a practical guide to laboratory protocols*. Ed. Chapman & Hall, 228p, 1994.

COOPER, C.M. *Solvent Recovery*. Michigan: ECT. ed. 2, v. 18,1970.

DAROLT, M. R. *Lixo rural: entraves, estratégias e oportunidades*. Disponível em: <<http://www.planetaorganico.com.br/trabdarlixo.htm>>. Acesso em: 20 jun. 2009.

Embrapa Informação Tecnológica. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Secretaria de Produção e Agroenergia. *Plano Nacional de Agroenergia 2006-2011*. 2. ed. Brasília: DF, 2006.

Energia e Desenvolvimento Sustentável da Região Norte. Valorização de resíduos orgânicos. Disponível em: www.gaiaglobal.pt/gaia/attachs.pdf?CONTENTITEMOID=17848080808280GC&CLASSTOKEN=eds_download&ATTRIBUTEID=download>. Acesso em: 21 mai. 2009.

FOUNTOULAKIS, M.; LAHM, HW. *Review hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins*. Journal of Chromatography A, v. 826, p. 109-134, 1998.

FRANKS, F. *Protein Biotechnology: Isolation, Characterization and Stabilization*, in: The human press Inc., Totowa, New Jersey, 1993.

FRASER, B. R.D.; PARRY, D. A.D. *Molecular Packing in the feather keratin filament*. Journal of Structure Biology, v. 162, p. 1-13, 2008.

FREDDI, G.; TSUKADA, M.; SHIOZAKI, H. *Chemical modification of wool fibers with acid anhydrides*. Journal of Applied Polymer Science, v. 71, p. 1573-1579, 1999.

FLORIS, T.; ARNOLDS, G. *Methods for producing a low reducing agent-containing keratin and products thereof*. n. WO 2006058673, 1 dez. 2004, 8 jun. 2006.

FRIEDRICH, A.B.; ANTRANIKIAN, G. *Keratin degradation by *Fervidobacterium pennavorans*: a novel thermophilic anaerobic species of the order thermotogales*. Applied and Environmental Microbiology, v. 62, n. 8, p. 2875-2882, 1996.

FONSECA, L.C.; CORREA, N.C.R.; GARROTE-FILHO, M.S.; CUNHA, C.C.; PENHA-SILVA, N. *Efeito da composição do solvente sobre a estabilidade de proteínas em soluções aquosas*. *Química Nova*, v. 29, n.3, p. 543-548, 2006.

FUJYIA, N.M. *Análise de hidrolisados de proteína de uso cosmetológico por eletroforese capilar*. 2001.130f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2001

GOUSTEROVA, A. *Degradation of keratin and collagen containing wastes by newly isolated thermoactinomycetes or by alkaline hydrolysis*. Letter in Applied Microbiology, v. 40, p. 335, 2005.

GRAZZIOTIN, A.; PIMENTEL, F.A.; SANGALI, S.; JONG, E.V.; BRANDELLI, A. Production of feather hydrolisate by keratinolytic bacterium *Vibrio* sp. Kr2. *Bioresource Technology*, v.8, p.547-550, 2006.

HAAG, M.; MEYER, H.E.; SCHOLLMAYER, P.; HORL, W.H. *Characterization of non-TCA-precipitable 'Lowry protein' in plasma of patients with acute renal failure*. *Clinica Chimica Acta*, V. 170, p. 181-186, 1987.

HARBORTH, H.J. *Dauerhafte Entwicklung statt globaler Selbstzerstörung-Eine Einführung in das Konzept des "sustainable development"*. Berlin: Sigma, 1991.

HARRAP, B.S.; WOODS, E.F. *Soluble derivatives of feather keratin*. *Biochemical Journal*, v. 92, n. 8, p. 8-18, 1964.

HOOD, C.M., HEALY, M. G. *Bioconversion of waste keratins: wool and feathers*. *Resources. Conservation and Recycling*, v. 11, p. 179-188, 1994

KAWASAKI, Glenn, H. *Method for Solubilizing Keratinaceous Materials Using Alkaline Hydrogen Peroxide Solution*. WO/1990/001023, 02 fev. 1990.

KIM, W.K.; LORENZ, E.S.; PATTERSON, P.H. *Effect of enzymatic and chemical treatment on feather solubility and digestibility*. *Poultry Science*, v. 81, p. 95-98, 2002.

KOHARA, N.; NAKAJIMA, T. *Influence of Succinylation on the Interactions of Wool Fibers and Water*. *Textile Research Journal*, v. 74, n. 10, p. 856-860, 2004.

KUZUHARA, A. *Chemical Modification of Keratin Fibers Using 2- Iminothiorane Hydrochloride*. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 90, p. 3646-3651, 2003.

LAHL, W.; BRAUN, S.D. *Enzymatic production of protein hydrolysates for food use*. *Food Technology*, v. 48, n. 10, p.68-71, 1994.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J. FARR, A.L. RANDALL, R.J. *Protein Measurements with the folin phenol reagent*. *Journal of Biological Chemistry*, v.193, p. 265-275, 1951.

MACLEOD, G. & SEYYDAIN-ARDEBILI, M. *Natural and simulated meat flavors*. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, v.14, p.309-347, 1981.

MENEZES, J.F.S.; ANDRADE, C.L.T.; ALVARENGA, R.C.; KONZEN, E. PIMENTA, F.F. *Utilização de resíduos orgânicos na agricultura*. In: AGRISHOW, 1, Ribeirão Preto, 2002. Disponível em: <<http://www.agrishow.com.br/>>. Acesso em: 20 jun. 2009.

MOORE, G.R.P.; MARTELLI, P.D.; ANDREO, C.A.; GANDOLFO, R.F.A. Obtenção de biofilmes a partir da queratina das penas de frango. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, n.2, p. 421-427, 2006.

NELSON, D. L., COX, M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3. New York: Ed. Worth Publishers, 2000, p. 115-125a.

_____. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3. New York: Ed. Worth Publishers, 2000, p. 170-175b.

PADILHA, A. C. M.; SILVA, T. N.; Sampaio, A. *Desafios de Adequação à Questão Ambiental no Abate de Frangos: O caso da perdigão Agroindustrial – Unidade Industrial de Serafina Corrêa – RS*. Teoria e Evidência Econômica, v. 14, Ed. Especial p.109-125, 2006.

POOLE, A.J. *Environmentally sustainable fibers from regenerated protein*. *Biomacromolecules*, v. 10, n.1, p.5, 2009.

REBOUÇAS, A.C. *Água e o desenvolvimento rural*, v. 15, n. 43, p. 327-344, 2001.

RIBEIRO, E.P.; SERAVALLI, E.A.G. *Química dos Alimentos*. 2.ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2007.

SCHMIDT, W.F. *Innovative feather utilization strategies*. In_ National poultry waste management conference proceeding, v. 98, Springdale, Arkansas, USA; 1998. p. 276-82.

SCHOR, R.; KRIMM, S. *Studies on the structure of feather keratin II*. *Biophysical Journal*, v. 1, p. 489-507, 1961.

SCHROOYEN, P.M.M.; DIJKSTRA, R.C.O.; BANTJES, A.; FEIJEN, J. *Partially Carboxymethylated Feather Keratins. 2. Thermal and Mechanical Properties of Films*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, p.221-230, 2001.

SBRT: Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas. *Extração de queratina e métodos para determinação de nitrogênio total*. Disponível em:< www.sbrt.ibict.br>. Acesso em: 15 jan. 2008.

SEWALD, N.; JAKUBKE, HD. *Peptides: chemistry and biology*, Ed. Wiley-VCH, Bielefeld, Germany, 2002.

SILVA, C.J.S.M.; VASCONCELOS, A. CAVACO-PAULO, A. *Peptide structure: its effect on penetration into human hair*. *Journal of Cosmetic Science*, v. 58, p. 339-346, 2007.

SOLOMONS, G.T.W.; FRYHLE, C.B. *Química Orgânica 1*. 8. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005.

THOREAU, H. D. *A desobediência civil*. Porto Alegre:L&PM, 1849.

TING; C.; YAOMING; Z.; CHONGLING, Y. *A study on hair care of feather keratin*. *Xiangliao Xiangjing Huazhuangpin*, n.5, p. 14-16, 2007.

VELASCO, M.V.R. *Desenvolvimento e padronização de gel contendo papaína para uso tópico*. São Paulo: EdUSP, 1993.

VELISEK, J.; DAVIDEK, T.; DAVIDEK, J.; HAMBURG, A. *3-Chloro 1,2-propanediol derived amino alcohol in proteinhydrolysates*. *Journal of Food Science*, v.56, p.136-138, 1991.

VILLA, A. L.V.; ARAGÃO, M. R. S.; MAZOTTO, A. M.; VERMELHO, A. B., SANTOS, E. P. *O efeito de peptídeos de hidrolisados de proteínas de penas de frango na hidratação capilar*. In: Congresso Brasileiro de Cosmetologia, 22, *Cosmetics and toiletries*, 2, São Paulo, 2008. Resumos. São Paulo: *Cosmetics and Toiletries*, 2008. res.QO-42.

WELTKOMMISSION, U.E. *Unsere gemeinsame Zukunft*. In :Volker Hauff Greven, 1987.

ZAHN, H.; KUNITZ, F.W.; MEICHELBECK, H. (1961). *Structure de la laine*. Institute of Textile France, p. 227 *apud* ARAI, K.; NAITO, S.; DANG, V. B.; NAGASAWA, N. HIRANO, M. *Crosslinking Structure of keratin. VI. Number, type, and location of disulfide crosslinkages in low-sulfur protein of wool fiber and their relation to permanent set*. *Journal of applied polymer science*, v. 60, p. 169-179, 1996.

