

Geovana Rocha Plácido

**EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E USO DA QUERATINA DE PENAS DE
FRANGO PARA A OBTENÇÃO DE FILMES BIODEGRADÁVEIS**

**Tese de doutorado apresentado ao Curso de Pós-
Graduação em Engenharia Química do Centro
Tecnológico da Universidade Federal de Santa
Catarina**

Orientador: Prof. Dr. Ariovaldo Bolzan

Co-Orientador: Prof. Dr. João Borges Laurindo

Florianópolis –SC

2007

Dedico aos meus queridos avós, Matilde e Isnard Valentim,
Com Todo amor.

AGRADECIMENTOS

À Deus por estar presente em minha vida.

Aos meus orientadores João Borges Laurindo e Ariovaldo Bolzan, pela oportunidade de trabalhar nesta área de biofilmes, por compartilhar seus conhecimentos e pela extrema paciência que tiveram comigo.

A todos do Laboratório PROFI, Fabinho, Eduardo, Sílvia, Sabrina, Léo, Bruno. por todos os momentos compartilhados, em especial a Cristhiane Gandolfo pela amizade e ajuda na parte experimental.

A todos da secretaria de Pós- Graduação, em especial ao Edvilson, pela ajuda e a sempre boa disposição em atender-me.

A todos membros da banca examinadora pelas sugestões e pelo trabalho de correção de tese.

À amiga Ana Maria Hecke, que ganhei durante esta trajetória, por sua bondade, por dividir sua sabedoria sem pedir nada em troca, pela força em todos os momentos, por acreditar em mim.

Aos meus amigos de Rio Verde, Iracéu, Daniel Tizo, Mônica, Ana Maria Giraldi que me acolheram com muito carinho e pela disponibilidade a mim dispensada em vários momentos.

Aos amigos Euler e Beatriz, pelos momentos de descontração e alegria.

À minha família, pelo amor, apoio e compreensão. Em especial, aos meus filhos, Júlia e Gabriel pela compreensão dos momentos que os privei de meu convívio.

Ao André Luiz Cândido pela força e apoio nos horas que mais precisei, e nos momentos de alegria e descontração.

À Finep, pela bolsa concedida e pela compra de reagentes e equipamentos.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1. Introdução.....	15
2.2. Panorama Geral.....	15
2.3. Biofilmes de Proteínas.....	21
2.4. Queratina.....	23
2.5. Obtenção de filmes de queratina.....	26
2.6. Reticulação da solução filmogênica com aldeídos.....	28
2.7. Estudo da transferência de massa de materiais flexíveis em estado estacionário.....	31
2.8. Biodegradabilidade.....	34
2.8.1. Definições.....	34
2.8.2. Mecanismos de degradação.....	36
2.8.3. Influência da morfologia do polímero.....	36
2.9. Solubilidade em água e índice de inchamento.....	37
2.10. Propriedades térmicas.....	37
2.11. Densidade, propriedades estruturais e mecânicas.....	38
2.12. Propriedades de sorção de umidade.....	39
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.1. Extração de queratina.....	42
3.1.1. Materiais.....	42
3.1.2. Limpeza das penas.....	42
3.1.3. Processo de extração da queratina.....	42
3.2. Caracterização da queratina.....	43
3.2.1. Determinação das massas molares de queratina por eletroforese (SDS-PAGE).....	43
3.2.2. Perfil de aminoácidos.....	43
3.2.3. Estudo da estabilidade térmica da queratina.....	44
3.3. Biofilmes de queratina de penas de frango.....	43
3.3.1. Preparação dos filmes plastificante.....	43
3.3.2. Reticulação dos filmes de queratina.....	45
3.4. Caracterização dos Biofilmes.....	44
3.4.1. Propriedades mecânicas.....	45
3.4.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	45
3.4.3. Permeabilidade ao vapor de água (K^w).....	45
3.4.4. Massa específica (ρ).....	46
3.4.5. Índice de inchamento.....	46
3.4.6. Isotermas de sorção.....	46
3.4.7. Solubilidade em água.....	47
3.4.8. Teste de biodegradabilidade dos filmes de queratina.....	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4.1. Extração da queratina.....	51
4.2. Perfil de aminoácidos.....	52

4.3 Isotermas de sorção de umidade da queratina liofilizada.....	54
4.4 Termogravimetria (TG) e termogravimetria derivada (DTG).....	55
4.5 Determinação das massas molares de queratina por eletroforese (SDS-PAGE).....	57
4.6 Caracterização dos Biofilmes	58
4.6.1 Propriedades mecânicas dos biofilmes	58
4.6.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	61
4.6.3 Permeabilidade ao vapor de água (K^w).....	61
4.6.4 Permeabilidade ao vapor de água (K^w), hidrofiliçidade (β) e coeficiente de difusão efetivo (D_{ef}).....	64
4.6.5 Isotermas de sorção de umidade e hidrofiliçidade (β) para os filmes de queratina.....	68
4.6.6 Análise Termogravimetria (TG) e termogravimetria derivada (DTG).....	70
4.6.7 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	72
4.6.8 Solubilidade em água e índice de inchamento.....	73
4.6.9 Teste de biodegradabilidade nos filmes de queratina.....	75
4.7 Reticulação dos biofilmes com glutaraldeído.....	78
CONCLUSÕES	80
Caracterização da extração de queratina	80
Caracterização dos biofilmes.....	80
SUGESTÕES	81
REFERÊNCIAS	82

LISTA DE ABREVIATURAS

δ	espessura
β	hidrofilicidade do material [g de água/(kg matéria seca*Pa)]
σ	tensão de ruptura
ρ^s	massa específica seca (Kg matéria seca/m ³)
$-(X_1-X_2)-$	diferença de umidade (Kg água/Kg matéria seca)
ASTM	American Society for testing and materials
A_w	atividade de água (UR/100)
b.s.	base seca
D_{eff}	difusividade mássica efetivada água (m ² /s)
DSC	calorimetria exploratória diferencial
ε	deformação na ruptura (%)
J_w	fluxo de massa
K^w	permeabilidade ao vapor d'água [g água * mm/m ² * Pa*h]
m	massa (g)
massa _{seca,1}	massa seca dos biofilmes antes da imersão
massa _{seca,2}	massa seca dos biofilmes após imersão em água
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MM	massa molar
Pa	Pascal
pH	potencial hidrogeniônico
Ps	pressão de saturação do vapor d'água
S	área superficial
SF	solução filmogênica
S_{fw}	solubilidade em água (%)
t	tempo (min)
T_{onset}	temperatura inicial de degradação
T_g	temperatura de transição vítrea (° C)
TG	termogravimetria
T_m	temperatura de fusão
T_{max}	temperatura de degradação máxima
UR	umidade relativa
W	taxa de transferência ao vapor d'água (g água/h)
DTG	termogravimetria derivada

HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
GAB	constante Guggenheim-Anderson-de-Boer

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Ciclo do material biodegradável.....	17
FIGURA 2	Principais matérias-primas utilizadas na obtenção de polímeros naturais.....	20
FIGURA 3	Representação de resíduos de aminoácidos na cadeia polipeptídica.....	21
FIGURA 4	Corte transversal de uma microfibrila de cabelo.....	23
FIGURA 5	Estrutura da α e β queratina	24
FIGURA 6	Mecanismo da reação da queratina com agentes oxidantes e redutores.....	26
FIGURA 7	Solução de queratina em uma membrana de diálise.....	27
FIGURA 8	Esquema da reação entre o glutaraldeído e a queratina.....	29
FIGURA 9	Esquema da célula de difusão utilizada na determinação gravimétrica PVA.....	33
FIGURA 10	Fluxograma dos procedimentos utilizados para extração e caracterização de penas de frango para obtenção de filmes biodegradáveis.....	40
FIGURA 11	Esquema representativo do processo usado para a obtenção de filmes de queratina de penas de aves.....	43
FIGURA 12	Isotermas de sorção da queratina liofilizada a 35 e 25 °C.....	53
FIGURA 13	Curvas termogravimétricas da pena e queratina extraída e liofilizada, realizadas a uma taxa de aquecimento de 10 °C min ⁻¹	55
FIGURA 14	Eletroforese em SDS-PAGE da preparação de queratina.....	56
FIGURA 15	Micrografia da superfície de biofilmes de queratina (MEV).....	61
FIGURA 16	Valores de hidrofobicidade (β) para os filmes sem glicerol e com 0,05 e 0,09 g glicerol/ g queratina.....	66
FIGURA 17	Isotermas de sorção de umidade de biofilmes de queratina com diferentes concentrações de plastificante.....	67
FIGURA 18	Curvas termogravimétricas para filmes de queratina com diferentes concentrações de glicerol.....	69
FIGURA 19	Tensão de ruptura e módulo de elasticidade em função da temperatura de transição vítrea.....	72
FIGURA 20	Solubilidade em água para os biofilmes de queratina com diferentes concentrações de glicerol.....	72
FIGURA 21	Índice de inchamento para os biofilmes de queratina com diferentes concentrações de glicerol.....	73

FIGURA 22	Análise visual da biodegradabilidade dos biofilmes.....	75
FIGURA 23	Micrografias de MEV dos biofilmes com 0,05g de glicerol/g proteína a) sem degradação e b) após 7 dias de degradação em solo (200 x).....	76
FIGURA 24	Aspecto visual dos biofilmes de queratina. a) sem reticulante; b – com o reticulante glutaraldeído a 1,33%.	77

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Polímeros biodegradáveis	18
TABELA 2	Aminoácidos laterais da cadeia disponíveis para modificações químicas	28
TABELA 3	Tipos de degradação	34
TABELA 4	Influência da temperatura no rendimento da extração de queratina	51
TABELA 5	Análise da composição de aminoácido da queratina reduzida	52
TABELA 6	Valores das constantes da equação de GAB a 25 e 35°C calculados por regressão não linear	54
TABELA 7	Parâmetros térmicos da queratina e pena de frango	55
TABELA 8	Efeito da concentração do glicerol nas propriedades mecânicas dos biofilmes de queratina	59
TABELA 9	Permeabilidade ao vapor d água nos filmes de queratina com glicerol e outros filmes protéicos.....	63
TABELA 10	Permeabilidade ao vapor d água, adsorvidade e coeficiente de difusão para biofilmes de queratina	64
TABELA 11	Valores das constantes do modelo de GAB a 35°C, para biofilmes de queratina com diferentes concentrações de glicerol	68
TABELA 12	Dados obtidos das curvas TG e DSC para os filmes de queratina com diferentes concentrações glicerol.....	70

RESUMO

Nas últimas décadas, o interesse por substituir os polímeros sintéticos, que até hoje são utilizados como material de embalagem, por polímeros naturais, tem aumentado devido ao impacto ambiental. Estudos com proteínas, como a queratina, demonstraram a capacidade de formar filmes. A queratina é uma proteína fibrosa encontrada na lã, pena, bicos, unhas e nos tecidos epiteliais. No Brasil, a pena de frango é um material abundante, sendo utilizada apenas como constituinte na ração animal, portanto, de baixo valor agregado. Esta proteína pode ser utilizada na obtenção de materiais biodegradáveis como uma alternativa para agregar valor a esta matéria-prima. Os biofilmes obtidos a partir de proteínas apresentam boas propriedades mecânicas, porém com baixa capacidade de formar barreira ao transporte de umidade. O comportamento de barreira dos biofilmes de queratina com diferentes concentrações de glicerol foi estudado por meio de sua hidrofobicidade da derivação da constante Guggenheim-Anderson-de-Boer (GAB), sendo este um dos parâmetros para verificar sua aplicabilidade na produção de embalagens. O objetivo da primeira etapa deste trabalho foi adequar um método para a extração da queratina de penas de frangos e caracterizar as suas propriedades quanto à massa molar, perfil de aminoácidos e propriedades térmicas. A extração da queratina das penas foi realizada utilizando-se uma solução contendo uréia, mercaptoetanol, surfactante e água, em pH 9,0 a diferentes temperaturas (40, 50, 60, 70 e 80 °C). Foi possível obter queratina solúvel com rendimento de 94% com relação a massa seca após 1 hora de solubilização das penas para uma temperatura de 50 °C. Após sua extração, a solução de queratina foi dialisada resultando em um gel branco e opaco, que foi liofilizado antes da realização das análises físico-químicas. O aumento de temperatura de extração diminuiu o rendimento da massa molar. O teor de proteína foi determinado pelo método do biureto, onde se obteve 7% m/v. A massa molecular foi em torno de 10 a 14 g/mol. Como esperado, o aumento da temperatura nas isotermas de sorção de umidade da queratina liofilizada diminuiu os valores de umidade na monocamada. Os termogramas de degradação indicaram que estabilidade térmica da queratina extraída apresentou uma sensível diminuição quando comparada com a pena. O objetivo da segunda etapa foi a produção de biofilmes com diferentes concentrações de glicerol e a caracterização destes quanto às propriedades térmica, mecânica, solubilidade em água, permeabilidade ao vapor d'água, biodegradabilidade e avaliar sua modificação química com o agente reticulante glutaraldeído. A solução formadora dos biofilmes foi preparada com 7 g de queratina/100 mL. A adição do plastificante glicerol na solução filmogênica (0,01; 0,03; 0,05; 0,07 e 0,09 g de glicerol/ g de queratina) resultou na diminuição da tensão de ruptura de $16,6 \pm 5,5$ para $2,0 \pm 0,2$ MPa, aumentou a deformação na ruptura de $1,7 \pm 0,7$ % para $31,9 \pm 4,5$ %, aumentou a permeabilidade de água para os biofilmes de queratina de $5,19 \times 10^{-8}$ para $5,43 \times 10^{-7}$ g.m/m² h Pa e a solubilidade dos biofilmes em água de 30,7 a 50,7 %. As análises térmicas mostraram que o acréscimo de glicerol diminuiu a temperatura de transição vítrea. O agente reticulante glutaraldeído reduziu a solubilidade dos biofilmes em água na ordem de 0,56 vezes comparado com os biofilmes sem tratamento. A biodegradabilidade dos filmes de queratina aumentou com a presença de glicerol. O uso do conceito de hidrofobicidade foi muito útil para entender o fenômeno de controle de barreira de água oferecido pelo biofilme e pode ser utilizado como procedimento para investigar este fenômeno em outras situações.

Palavras chaves: filmes biodegradáveis, plastificante, glicerol, proteínas, queratina, penas de frango, resíduos.

ABSTRACT

In the last decades, the interest for substituting the synthetic polymeric, which are used as packing material until the present days, for natural polymeric has been increasing due to the environmental impact. Studies with proteins, as keratin demonstrated the capacity to form films. The keratin is a fibrous protein found in the wool, feather, beaks, nails and in the epithelial tissues. In Brazil, the chicken feather is an abundant material being used just as constituent in the animal ration, therefore, of low aggregated value. This protein can be used for obtaining of biodegradable materials as an alternative to aggregate value to this raw material. The biofilms obtained from proteins present good mechanical properties, however, with low capacity to form a barrier to the humidity transport. The of barrier behavior of the keratin biofilms with different glycerol concentrations was studied by its hydrophilicity through the derivation of the constant Guggenheim-Anderson-de-Boer (GAB), being this one of the parameters to verify its applicability in the production of packaging. The objective of the first stage of this assignment was to adapt the method for the extraction of keratin from chicken feathers and to characterize its properties concerning the molar mass, amino acids profile and thermal properties. The extraction of keratin from feathers was performed by using a solution containing urea, mercaptoethanol, surfactant and water, at pH 9,0 at different temperatures (40, 50, 60, 70 and 80 °C). It was possible to obtain soluble keratin with revenue of 94% concerning the dry mass after 1 hour of solubilization of the feathers for a temperature of 50°C. After its extraction the keratin solution was dialyzed resulting in a white and opaque gel, which was lyophilized before the accomplishment of the physical-chemical analyses. The increase of the extraction temperature reduces the revenue of the molar mass. The protein tenor was determined by the biuret method, where 7% m/v was obtained. The molar mass was approximately of 10 to 14 g/mol. As expected, the increase of the temperature in the isotherms of humidity sorption of the lyophilized keratin reduced the humidity values in the monolayer. The degradation thermograms indicated that thermal stability of the extracted keratin presented a slight decrease when compared to the feather. The objective of the second stage was the biofilm production with different concentrations of glycerol and their characterization concerning the thermal, mechanical properties, solubility in water, permeability to the water vapor, biodegradability and to evaluate their chemical modification with the glutaraldehyde reticulant agent. The forming solution of the biofilms was prepared with 7 g of keratin/100 mL. The addition of the glycerol as a plasticizer in the filmogenic solution (0,01; 0,03; 0,05; 0,07 and 0,09 g of glycerol / keratin g) resulted in the decrease of the rupture tension from $16,6 \pm 5,5$ to $2,0 \pm 0,2$ MPa, increased the prolongation in the rupture from $1,7 \pm 0,7$ % to $31,9 \pm 4,5$ %, increased the permeability of water for the keratin biofilms from $5,19 \times 10^{-8}$ to $5,43 \times 10^{-7}$ g.m/m² h Pa and the solubility of the biofilms in water increased from 30,7 to 50,7 %. The thermal analyses showed that the increase of the glycerol concentration reduced of vitreous transition temperature. The glutaraldehyde reticulant agent reduced the solubility of the biofilms in water in the order of 0,56 times compared to the biofilms without treatment. The biodegradability of the keratin films increased with the glycerol presence. The use of the hydrophilicity concept was very useful to understand the phenomenon of water barrier control offered by the biofilm and it can be used as procedure to investigate this phenomenon in other situations.

Key words: keratin, chicken feathers, biofilm, biodegradable materials, plasticizers, glycerol, protein, waste.

1. INTRODUÇÃO

A interação das atividades industriais com a preservação do meio ambiente é tema da maior relevância política e social na atualidade. Nas últimas décadas, o interesse por substituir os polímeros sintéticos, que até hoje são utilizados como material de embalagem, por polímeros naturais tem aumentado. Os materiais sintéticos garantem uma proteção desejada para diversos tipos de produtos, mas apresentam o inconveniente de não serem biodegradáveis. Estes materiais contribuem em aproximadamente 20% do total de desperdícios no mundo, causando sérios distúrbios ecológicos (HALLEY *et al.*, 2001).

A utilização de matérias-primas de origem animal e vegetal para a produção de biofilmes representa uma alternativa para o desenvolvimento tecnológico ambientalmente sustentável. O uso de polissacarídeos, lipídeos e proteínas na fabricação de materiais biodegradáveis e biofilmes comestíveis cresceram consideravelmente nos últimos vinte anos, motivado pelas suas vantagens ecológicas sobre as embalagens poliméricas convencionais.

Muitos pesquisadores focalizam suas atenções na excelente capacidade das proteínas formarem biofilmes, que podem ser aplicados na obtenção de embalagens descartáveis, materiais para implante e recobrimentos comestíveis para alimentos. Algumas proteínas despertam o interesse para a elaboração de biofilmes, entre as quais se destacam as proteínas da soja, o glúten, a gelatina, o colágeno e a queratina de lã (GENNADIOS *et al.*, 1994; BARRETO *et al.*, 2003; IRISSIN-MANGATA *et al.*, 2001).

As penas de frangos são compostas basicamente por 90 % de proteína, na forma de queratina, que atualmente vem sendo utilizadas na indústria de processamento de aves para formulação de ração animal. Considerando-se que as penas representam de 5 a 7% da massa dos frangos (ONIFADE *et al.*, 1998) e que o Brasil é o terceiro produtor mundial dessa ave (USDA, 2006) pode-se avaliar a grande disponibilidade dessa proteína na indústria de processamento de frangos.

De acordo com dados divulgados pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos USDA, a produção mundial de carne de frangos em 2006 foi de 9,3 milhões de

toneladas, sendo que Estados Unidos, China e Brasil foram responsáveis por cerca de 35 milhões de toneladas.

Apesar da queratina da pena ser um recurso abundante na indústria de processamento de aves, pouca atenção é dada à mesma. Estudos detalhados quanto aos métodos de extração e às suas propriedades físico-químicas são necessários para sua aplicação na obtenção de biofilmes destinados à fabricação de embalagens biodegradáveis e outros materiais.

A primeira etapa desta tese teve como objetivos: adequar um método para a extração da queratina de penas de frangos; determinar as características físico-químicas da queratina extraída; e avaliar seu uso para obtenção de biofilmes biodegradáveis.

A segunda etapa do trabalho teve como objetivos caracterizar os biofilmes obtidos quanto às propriedades funcionais (mecânicas, solubilidade e barreira ao vapor d'água).

Para que os objetivos fossem alcançados realizaram-se os seguintes estudos:

- Definição das condições de extração e caracterização da queratina de penas quanto à massa molar, perfil de aminoácidos e propriedades térmicas;
- Obtenção de biofilmes de queratina de pena de aves pela técnica de *casting* (evaporação de solvente);
- Estudo da influência do glicerol nas propriedades físicas, morfológicas, mecânicas e térmicas dos biofilmes;
- Estudo da reticulação dos filmes de queratina com glutaraldeído, quanto a solubilidade e propriedades mecânicas;
- Avaliação da biodegradabilidade dos biofilmes.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Introdução

Nesta revisão da literatura apresenta-se um panorama geral sobre a obtenção e utilização dos polímeros biodegradáveis, suas definições e classificações, assim como as vantagens e desvantagens da sua utilização. Apresenta-se também uma revisão sobre a queratina, o método de obtenção, suas aplicações e modificações em sua estrutura pelo uso de agentes reticulantes e também uma visão geral do que está sendo desenvolvido no mundo e no Brasil no que diz respeito aos materiais biodegradáveis.

2.2. Panorama Geral

Polímeros são artefatos fabricados a partir de resinas, geralmente sintéticos e derivados do petróleo, os quais são considerados inertes ao ataque de microrganismos. Essa propriedade faz com que esses materiais apresentem um tempo longo de vida e provoquem sérios problemas ambientais, visto que, após o seu descarte, demoram centenas de anos para se decomporem totalmente, aumentando assim a quantidade de lixo plástico descartado no ambiente (LAROTONDA, 2002; LEITE *et al*, 1999).

A utilização de polímeros sintéticos possui como principais características o baixo custo, fácil processamento, alta aplicabilidade e durabilidade, sendo esta última característica o fator de maior desvantagem para a sua utilização. Por ser um material hidrofóbico, o polímero não permite a ação microbiana, demorando centenas de anos para se decompor (LEITE *et al*, 1999).

‘Os polímeros são divididos em três categorias importantes: termofixos, termoplásticos e elastômeros. Os termofixos, que representam cerca de 20% do total consumido no país, são polímeros que, uma vez moldados por um dos processos usuais de transformação, não podem mais sofrer novos ciclos de processamento, pois não fundem novamente, o que impede nova moldagem (LEITE *et al*. 1999; LUCAS *et al*.)

Os termoplásticos, mais largamente utilizados, são materiais que podem ser reprocessados várias vezes pelo mesmo ou por outro processo de transformação. Quando submetidos ao aquecimento a temperaturas adequadas, esses polímeros amolecem, fundem e podem ser novamente moldados. Como exemplos, podem ser citados: polietileno de baixa

densidade (PEBD); polietileno de alta densidade (PEAD); poli(cloreto de vinila) (PVC); poliestireno (PS); polipropileno (PP); poli(tereftalato de etileno) (PET); poliamidas (náilon) e muitos outros (LEITE *et al.*, 1999).

As borrachas ou elastômeros são materiais macromoleculares que sofrem deformação imediata e exibem porcentagens altas de deformação e reversíveis quando, submetida a pequenas tensões (LUCAS *et al.*, 2001).

A produção de lixo teve um grande aumento em todos os países do mundo, devido ao crescimento populacional e econômico. Dados da Fundação Verde (FUNVERDE), relatam o consumo de um milhão de sacos plásticos por minuto em todo o mundo, o que significa quase 1,5 bilhão por dia. A cada mês, mais de um bilhão de plásticos são distribuídos nos supermercados no Brasil, ou seja, 66 sacos plásticos para cada brasileiro por mês (FIÚZA, 2007).

Em 2004, no Brasil foram despejados aproximadamente 2,2 milhões de resíduos plásticos, deste total, menos de 5% foram reciclados, ou seja, apenas 360 toneladas (FIÚZA, 2007).

Novas leis ambientais, responsabilidades sociais, aliadas a um crescimento da consciência ambiental em todo o mundo desencadearam na busca por novos produtos e processos que sejam compatíveis com o meio ambiente. Sustentabilidade, ecologia industrial e química verde são os novos princípios que estão guiando o desenvolvimento da nova geração de produtos e processos. O impacto dos recursos naturais usados na fabricação de um produto e último destino (descarte) do mesmo, quando ele entra na cadeia do lixo, tem sido considerado no desenvolvimento dos produtos. O uso de polímeros naturais, um recurso renovável, bem como a biodegradabilidade e a reciclabilidade estão se tornando importantes critérios de desenvolvimento de produtos. Isto abre novas oportunidades de mercado para o desenvolvimento de produtos com maior valor agregado baseados em fontes de polímeros naturais (NARAYAN, 2000).

Por vários anos, vem-se tentando estabelecer novos mercados para materiais biodegradáveis. Na Alemanha, houve uma grande demanda no setor de embalagens e no uso de materiais biodegradáveis. O interesse por produtos biodegradáveis na Alemanha é grande que levou o governo, recentemente regulamentar uma lei, em que todas as embalagens com certificação (embalagens biodegradáveis de acordo com a norma, DIN EN 13432) estarão isentas, até 2012, da taxa de reciclagem DSD (DSD-Duales System Deutschland), independente da matéria-prima utilizada (OLDENBURGER, 2005).

O ponto de partida para o desenvolvimento de materiais biodegradáveis foi a partir do ciclo natural do carbono, o qual degrada aproximadamente 60 bilhões de toneladas de celulose anualmente. A degradação da celulose origina água, dióxido de carbono, que serão a próxima geração de matérias-primas renováveis (Figura 1) (SCHROETER,1997).

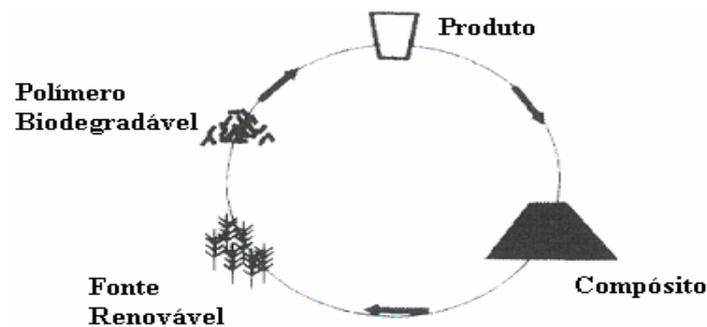


FIGURA 1 - Ciclo do material biodegradável. Fonte: SCHROETER, 1997.

No ciclo dos materiais biodegradáveis uma série de problemas dificultam a sua inovação de escala laboratorial para a indústria, tais como: a falta de legislação; a similaridade dos polímeros convencionais com os biodegradáveis, o qual dificulta a separação e a coleta seletiva dos mesmos; assim como o alto custo em relação aos polímeros convencionais (SCHROETER, 1997).

A produção nacional ainda é incipiente, abaixo de um ponto percentual no mercado brasileiro de resinas termoplásticas. Mas, as pesquisas começam a transpor as bancadas para chegar às indústrias. Existe grande movimentação do setor, a ponto de justificar projeções positivas. Segundo expectativas do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT), a demanda anual de polímeros biodegradáveis pode alcançar a marca de 20 mil toneladas nos próximos cinco anos. O apelo de marketing e o modismo ecológico também influenciam o avanço desse mercado, mas os principais responsáveis são os preços competitivos e a qualidade da matéria-prima oferecida ao transformador (PANCHIONE, 2005).

No entanto, algumas medidas para promover a biodegradabilidade de produtos geram controvérsias. Em alguns estados, como o Paraná, foram criadas medidas para reduzir o lixo através da distribuição gratuita de sacolas de supermercado oxi-biodegradáveis que decompõem em contato com o ar, calor e a umidade, num prazo de 18 meses. Mas há o risco destes materiais causarem impacto no meio ambiente e, portanto, precisam ser melhor estudados (BARONE, 2007).

No Brasil, a empresa que produz polímeros biodegradáveis é a PHB Industrial. Produz-se poli (3-hidroxibutirato) por via microbiana, o qual pode ser utilizado para a fabricação de polímeros biodegradáveis a partir de sacarose de cana-de-açúcar invertida. Na opinião de representantes do setor de polímeros biodegradáveis, a indústria nacional está aquém da internacional, quando o assunto é o comprometimento com a preservação do ambiente, sobretudo pela falta de legislação. Um dos entraves para a consolidação do conceito é a carência de normas, pois, sem parâmetros o processo de entrada do material biodegradável no setor de embalagens plásticas se torna moroso e custoso. Em outros países, há leis que justificam investimentos no setor industrial para polímeros biodegradáveis (PANCHIONE, 2005).

As contribuições para o desenvolvimento sustentável serão principalmente conseguidas à custa de: *i)* soluções energeticamente mais eficientes; *ii)* minimização da quantidade de material utilizado numa dada aplicação; *iii)* utilização de polímeros como meio de descontaminação ambiental; *iv)* materiais biodegradáveis (CUNHA, 2005).

Materiais biodegradáveis podem ser produzidos por várias tecnologias. Geralmente são termoplásticos, podendo ser processados pelos métodos convencionais (extrusão, injeção e revestimento).

A Tabela 1 mostra alguns os grupos de materiais biodegradáveis disponíveis atualmente.

TABELA 1. Relação de polímeros biodegradáveis disponíveis no mercado produzidos a partir de fontes renováveis e não renováveis.

Fontes renováveis	Fontes não renováveis
Polihidroxialcanoatos	Poli (ϵ -caprolactona)
Amido	Poliesteramidas
Nitrato de celulose	Poli (álcool vinílico)
Acetato de celulose	
Caseína	
Quitina	

Fonte: adaptado de SCHROETER, 1997

Segundo NAYAK (1999), os polímeros biodegradáveis são classificados de maneira geral em três categorias: polímeros naturais biodegradáveis; polímeros sintéticos biodegradáveis e polímeros naturais modificados biodegradáveis.

Os biopolímeros são geralmente produzidos na natureza por todos os organismos vivos, sem interferência humana. Estes materiais são derivados de recursos naturais como plantas e fermentação bacteriana (LAROTONDA, 2002).

Os polímeros naturais mais difundidos são os polissacarídeos como a celulose e o amido. Outras categorias importantes de polímeros naturais são os poliésteres, tais como os polihidroxicanoatos, as proteínas entre outros (NAYAK, 1999).

Vários compostos sintéticos de baixa massa molar são biodegradáveis, entretanto muito poucos compostos poliméricos sintéticos são biodegradáveis. Dentro dos polímeros sintéticos, os poliésteres alifáticos são geralmente conhecidos por serem susceptíveis ao ataque biológico. O poli (adipato de etileno) (PEA) e a poli (ϵ -caprolactona) (PCL) são degradados por *Pencillium sp.*, e poliésteres alifáticos e alicíclicos como os poliuretanos e copoliésteres são hidrolisados por várias lípases e esterases (NAYAK, 1999).

Como exemplo de polímeros naturais modificados biodegradáveis, existem misturas contendo somente polímeros naturais e misturas de polímeros naturais com sintéticos. Das várias misturas polímeros-polissacarídeos que foram testadas, a maioria é composta por amido, celulose e seus derivados, como os polissacarídeos. Atualmente, há interesse nas misturas plásticos-polissacarídeos, que são um pouco biodegradáveis. Estas misturas sugerem uma desejável alternativa aos polímeros não degradáveis. Os principais materiais degradáveis são as misturas de amido e polietileno (NAYAK, 1999).

As principais fontes de polímeros naturais são os polissacarídeos e as proteínas provenientes do leite, da soja, do algodão, do amendoim e de tecidos musculares, os quais têm sido utilizados para a obtenção de biofilmes biodegradáveis (GENNADIOS *et al.*, 1994; ARVANITOYANNIS *et al.*, 1998; SOBRAL, 2000; ANKER *et al.*, 2002; BIGI *et al.*, 2002; BARRETO *et al.* 2003). O amido e a celulose são citados como fontes de polímeros de polissacarídeos (ARVANITOYANNIS *et al.*, 1997; WELLER *et al.*, 1998; ANDRADE *et al.*, 2000; LAROTONDA, 2002; MATSUI, 2002).

Tharanathan (2003) também apresenta outras matérias-primas utilizadas na obtenção de polímeros naturais (FIGURA 2).

2.3. Biofilmes de Proteínas

As proteínas são heteropolímeros com propriedades termoplásticas, constituídas de aminoácidos polares e não-polares, que são capazes de formar numerosas ligações intermoleculares, as quais permitem uma ampla variação nas propriedades funcionais dos materiais resultantes (JANGCHUD, 1999). Sua estrutura está apresentada na Figura 3.

A elaboração de biofilmes a base de proteínas envolve vários componentes com finalidades específicas. De um modo geral, as formulações são constituídas pelos seguintes compostos: agente formador de filmes (macromoléculas), agente plastificante, solvente e de ajustes de pH (SOUZA, 2001).

A formação de uma matriz macromolecular a partir de proteínas compreende três etapas: 1- a ruptura das pontes intermoleculares de baixa energia que estabilizam o polímero em seu estado natural; 2- o rearranjo e orientação das cadeias poliméricas e 3- a formação de uma matriz tridimensional estabilizada por novas interações e pontes após o agente de ruptura das pontes intermoleculares ter sido removido (CUQ *et al.*, 1998).

Os biofilmes de proteína são hidrofílicos e possuem, sob certas condições de umidade relativa e temperatura, boas propriedades de barreira ao oxigênio e ao CO₂, mas uma fraca barreira ao vapor de água. Em produtos embalados (frutas), a barreira ao O₂ leva à redução na taxa de respiração, limitando a exposição ao ambiente com oxigênio e aumentando internamente o nível de dióxido de carbono, e com isso, retardando o amadurecimento. A fraca barreira ao vapor de água permite o seu movimento através do filme, com isso impede a condensação de água que pode favorecer o crescimento de microrganismos contaminantes (LAROTONDA, 2002).

Os filmes a base de proteínas de alta massa molar são geralmente insolúveis ou pouco solúveis em água, além de possuírem boas propriedades mecânicas (resistência e flexibilidade) (CARVALHO, 1997).

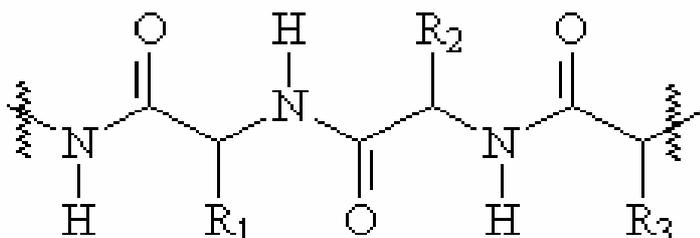


FIGURA 3 - Representação de resíduos de aminoácidos na cadeia polipeptídica R₁, R₂ e R₃ representam os resíduos de aminoácidos na cadeia polipeptídica de uma proteína.

Dentre as proteínas utilizadas como agente formador de biofilmes, destacam-se as de origem animal, como gelatina (CARVALHO, 1997; SARMENTO, 1999), proteínas miofibrilares de peixe (CUQ, 1997; MONTERREY *et al.*, 2000), proteínas miofibrilares de carne bovina (SOUZA, 2001), proteínas de soro de leite (McHUGH *et al.*, 1994; MATE *et al.*, 1996; MILLER *et al.*, 1997) e as de origem vegetal, como glúten, zeína e proteína de soja.

Na maioria dos estudos sobre biofilmes de proteína utilizaram-se glicerol e sorbitol como plastificante. Biofilmes de gelatina foram obtidos utilizando sorbitol como (CARVALHO, 1997; SARMENTO, 1999), cuja concentração influenciou nas propriedades mecânicas dos biofilmes.

Os filmes de proteína de soro de leite elaborados com sorbitol apresentaram menor permeabilidade ao vapor da água do que os elaborados com glicerol (ANKER *et al.*, 2000).

Outro componente do biofilme é o agente ajustador de pH, que também influencia a solubilidade da proteína. Para trabalhar com proteínas, o pH deve estar acima ou abaixo do ponto isoelétrico (pI), onde a proteína possui cargas disponíveis para interagir com a água e aumentando assim, a sua solubilidade, o qual permitirá a formação do gel (CARVALHO, 1997).

Existem muitos estudos que avaliaram o efeito do pH nas propriedades dos biofilmes. Wall e Beckwith (1969) obtiveram filmes a partir de uma solução de glúten, ácido láctico e água como solvente, mas eles mostraram-se muito quebradiços. Anker *et al.*, (1972) solubilizaram o glúten de trigo em aquecimento alcoólico e meio alcalino para obter filmes pelo método de evaporação de solvente, utilizando glicerol como plastificante. Biofilmes de proteína de glúten foram elaborados com 20 % de etanol em pH 5 (GONTARD *et al.*, 1992), enquanto os filmes de gelatina foram produzidos utilizando-se água destilada como solvente em pH 5,6 (CARVALHO, 1997; SARMENTO, 1999). Filmes de proteína miofibrilar de carne bovina foram obtidos utilizando-se água destilada como solvente em pH 2,8 (SOUZA, 2001).

Perez e Krotcha (2000) estudaram o efeito das condições de secagem dos biofilmes produzidos a partir de proteína de soro e de emulsões proteína-lipídeo, encontrando que o aumento na temperatura de secagem e 40% de umidade relativa diminuem a permeabilidade

ao vapor de água, em ambos os casos, e que as propriedades mecânicas não foram afetadas pelas condições de secagem.

2.4. Queratina

As queratinas são polipeptídeos formados por unidades de aminoácidos, com massa molar média da ordem de $10000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. É uma proteína fibrosa insolúvel em água e desempenha um papel basicamente estrutural. Uma característica peculiar da queratina quando comparada a outras proteínas fibrosas é a grande quantidade de resíduos de cisteína que a compõe, representando cerca de 7-20 % do total de aminoácidos (YAMAUCHI *et al.*, 1996).

A queratina pode apresentar-se na forma tridimensional de α -hélice (α -queratina) ou folhas- β -pregueadas (β -queratina), conforme esquematizado na Figura 4. Nos vertebrados, as principais epidermes tais como cabelos, penas, cascos, escamas, bicos e unhas são resultados de um processo de diferenciação de células epiteliais especializadas chamadas queratinócitos. Durante este processo, o tecido epitelial é convertido em um material inerte, fibroso, resistente e insolúvel em água, com pequenas diferenciações entre as várias espécies e que gera um ótimo revestimento de proteção externa (FRASER *et al.*, 1971; WODDIN, 1954).

A α -queratina dos pelos dos animais e do cabelo apresenta-se em α -hélice e é formada pela associação de 11 unidades de protofibrilas formando microfibrilas. Essas microfibrilas cujo diâmetro é de 80 \AA , aparecem em uma matriz protéica amorfa muito rica em enxofre. Centenas dessas microfibrilas se juntam para formar as macrofibrilas.

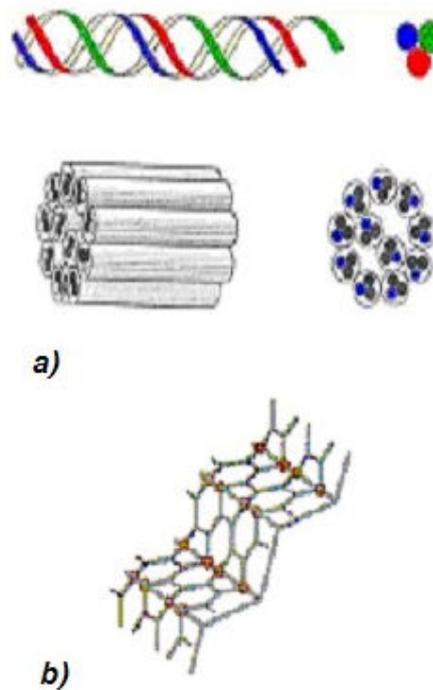


FIGURA 4 - Corte transversal de uma microfibrila de cabelo a) Corte transversal através de uma microfibrila de cabelo mostrando a estrutura em α -hélice das protofibrilas; b) β -queratina em folha pregueada. Fonte: MARZZOCO; TORRES , 1999.

Nas α -queratinas, duas ou três cadeias em α -hélice associam-se lateralmente, formando longos cabos helicoidais, que, reunidos, formam fibrilas e fibras. Nestas proteínas, é freqüente a formação de pontes dissulfeto entre resíduos de cisteína de cadeias polipeptídicas ou fibrilas adjacentes, conferindo grande resistência às fibras (Figura 5). O padrão de distribuição dessas pontes determina o grau de ondulação do cabelo e da lã. Já nas β -queratina, as fibras são formadas por empilhamento de folhas β pregueadas (MARZZOCO; TORRES, 1999).

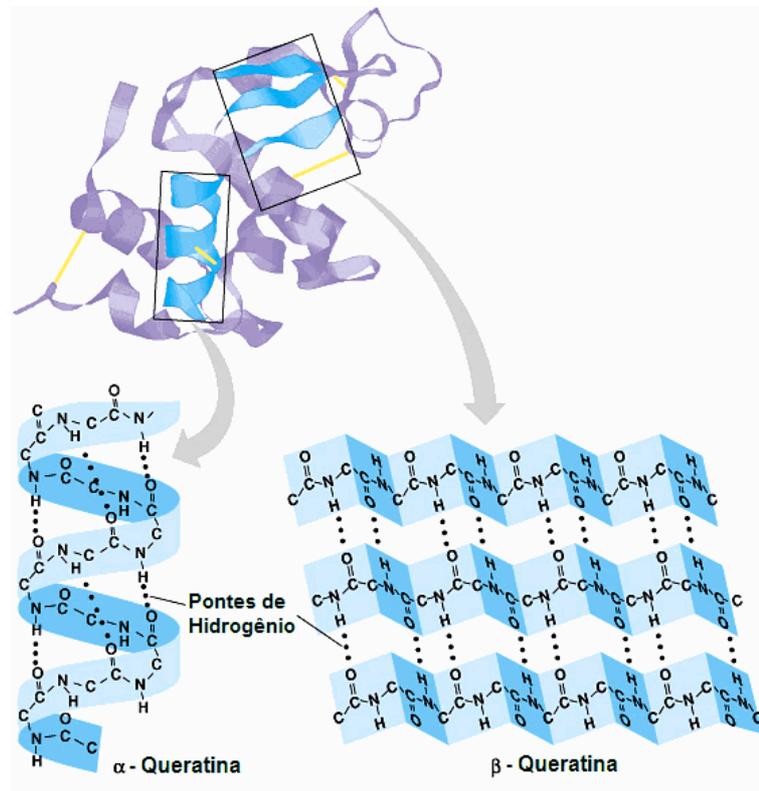


FIGURA 5 - Estrutura da α e β queratina

O conteúdo de aminoácidos sulfurados varia grandemente em diferentes tecidos queratinosos, numa mesma espécie. São as pontes dissulfeto que dão à queratina uma conformação rígida e sua insolubilidade em água (SCHROOYEN *et al.*, 2001). A estabilidade mecânica e a resistência à digestão proteolítica das penas são conseqüências do empacotamento das cadeias de proteínas nas formas de α e β queratina (ONIFADE *et al.*, 1998). Essas proteínas apresentam as cadeias de polipeptídeos fortemente associadas entre si, em estruturas paralelas. Em razão disso, são capazes de formar uma matriz contínua após a secagem, característica importante para obtenção de filmes (CUQ *et al.*, 1995).

O alto conteúdo de aminoácidos sulfurados, particularmente cisteína, torna a queratina insolúvel em água. Portanto, as penas têm que sofrer uma hidrólise parcial (ácida ou alcalina) para que haja a degradação parcial dos filamentos de queratina, tornando-a mais solúvel e mais digerível. Através da hidrólise a altas temperaturas, produz-se uma farinha de penas que constitui excelente fonte de aminoácidos sulfurados na formulação de rações (SGARBIERI, 1996).

2.5. Obtenção de filmes de queratina

Vários procedimentos estão descritos na literatura para extrair queratinas de lã e cabelo. Alguns métodos envolvem a cisão simultânea de ligações peptídicas (hidrólises ácida e básica), redução de pontes dissulfeto com soluções de sulfato de sódio alcalino ou a combinação de tratamentos enzimáticos e químicos com o uso de hidróxido de amônio. Processos sem cisões peptídicas significativas, em que somente pontes dissulfeto são rompidas, incluem sulfitólises ou oxidação de pontes dissulfeto com ácido perfórmico (SCHROOYEN *et al.*, 2001).

Schrooyen *et al.*, (2001) obtiveram biofilmes a partir de queratina de pena de frango quimicamente modificada. Em seus estudos avaliaram a influência da adição do lauril sulfato de sódio na dispersão de queratina e também a influência da concentração de glicerol em algumas propriedades dos filmes. A tensão máxima de ruptura destes filmes variou de 5 a 25 MPa, dependendo do grau de modificação da queratina. Quando utilizaram glicerol, a tensão máxima de ruptura variou de 5 a 35 MPa para filmes com 0,5 a 0,10 g glicerol/g queratina, respectivamente.

Yamauchi *et al.*, (1996) utilizaram um processo brando para extrair queratina de lã e cabelo, o qual envolveu o uso de tióis, como o 2-mercaptoetanol, para reduzir as pontes dissulfeto (Figura 6a e 6b) em soluções concentradas de uréia em pH moderadamente alcalino. Eles obtiveram filmes de queratina de lã com boa resistência mecânica, que apresentaram valores do módulo de elasticidade de até 205 MPa. Estes mesmos filmes mostraram menos permeáveis a sais e glicose do que filmes produzidos com colágeno.

Tanabe *et al.*, (2002) obtiveram filmes de queratina de lã e utilizaram blendas com quitosana para melhorar as propriedades dos filmes. Observaram que os materiais formados possuíam características superiores às dos filmes obtidos apenas a partir de queratina ou de quitosana. As blendas foram mais resistentes mecanicamente e apresentaram melhores propriedades de barreiras ao vapor d'água.

Os grupos tióis (SH) da queratina são facilmente oxidados pelo ar, gerando pontes de dissulfetos. Para evitar que isso ocorra, recorre-se à adição de ácido iodoacético (Figura 6c), que previne a formação de pontes de sulfeto, gerando materiais mais flexíveis (KATOH *et al.*, 2004).

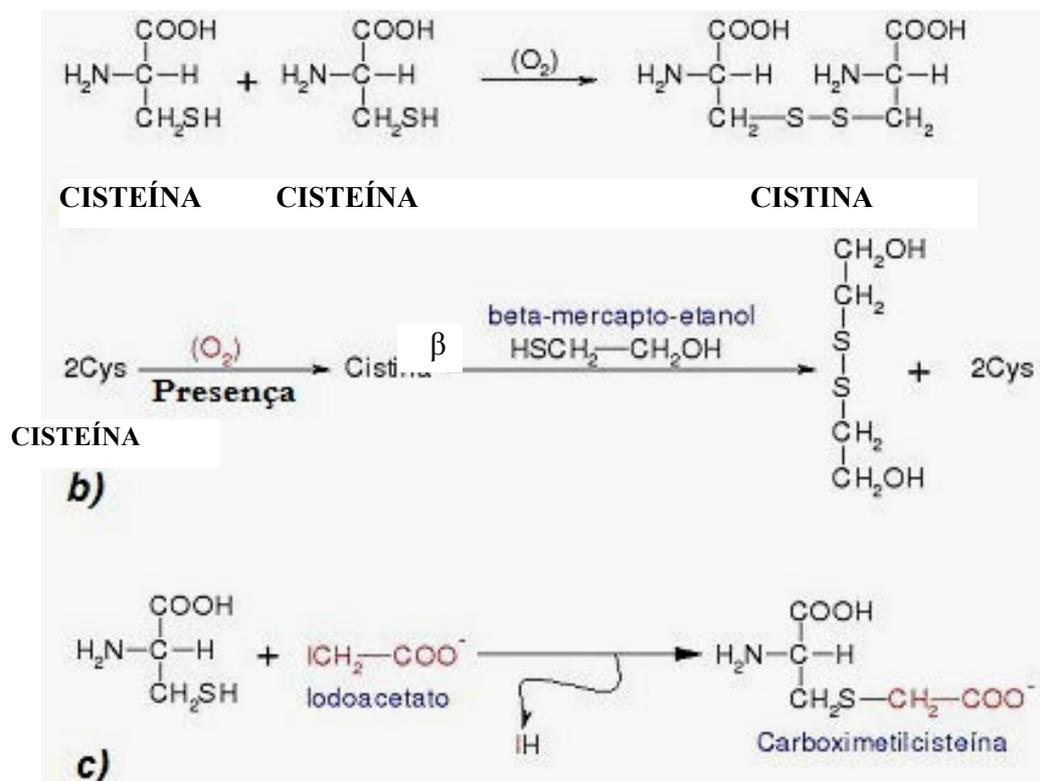


FIGURA 6 - Mecanismos da reação da queratina com agentes oxidantes e redutores. a) cisteína na presença de oxigênio, oxida-se para formar cistina; b) com a adição do mercapto-etanol a cistina é reduzida produzindo 2,2 ditioetanol e dois dímeros de cisteína; c) transformação da cisteína em carboximetilcisteína pela presença do ácido iodoacético. Fonte: adaptado de SCHROOYEN *et al.*, 2000.

Quando a queratina é solubilizada segundo o procedimento de Yamauchi, uma solução estável é obtida. A remoção do 2-mercaptoetanol e da uréia desta solução por diálise resulta na agregação das cadeias polipeptídicas de queratina, bem como na reoxidação dos resíduos de cisteína, resultando em um gel branco e opaco (Figura 7). Estudos mostraram que esponjas e filmes preparados com soluções de queratina reduzida, lã e cabelo são mecanicamente fortes e insolúveis em água (TANABE *et al.*, 2004).

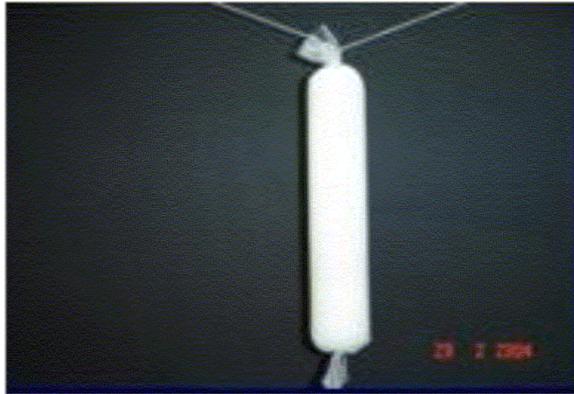


FIGURA 7- Solução de queratina em uma membrana de diálise. Fonte: Moore *et al.*, 2005.

Katoh *et al.*, (2004) preparou por evaporação por solventes biofilmes de solução de queratina reduzida, fixando-os em cultura de fibroblastos de ratos, os quais proliferaram, sugerindo que os filmes de queratina podem ser aplicados na área biomédica, de maneira similar ao colágeno.

Existem algumas patentes que abordam a obtenção de filmes de queratina. Dentre elas, pode-se citar o método de preparação de filmes e revestimentos de queratina, a produção de filmes, fibras, espumas e adesivos derivados de queratina S-sulfonada (KELLY *et al.*, 2003), membrana de queratina (KIKKAWA *et al.*, 1979), biopolímeros volumosos e porosos de queratina, além de material para implante (SCOTT *et al.*, 2003).

2.6. Reticulação da solução filmogênica com aldeídos

Os biopolímeros podem ser reticulados com o objetivo de conferir propriedades elastoméricas aos filmes, sendo que, quanto maior a densidade de ligações cruzadas, mais rígido é o material. A reticulação pode ser realizada por métodos físicos ao aplicar-se calor, radiação de extensão, por métodos químicos ou com o uso de enzimas (SABATO *et al.*, 2001; BIGI *et al.*, 1998).

A reticulação química das proteínas pode ser entendida como interações entre as cadeias poliméricas adjacentes, com a formação de ligações covalentes, que levam à formação de uma rede tridimensional (MARK *et al.*, 1985). Ela pode resultar na modificação do ponto isoelétrico e conformação estrutural, os quais, por sua vez, influenciam totalmente no comportamento funcional das proteínas. As características

específicas também podem ser afetadas por modificações químicas que incluem solubilidade, propriedades surfactantes, grau de hidratação, tendência para a gelatinização, estabilidade térmica (KESTER; RICHARDSON, 1984) e aumento da resistência ao transporte de gás e vapor de água (KESTER; FENNEMA, 1986).

A tabela 2 mostra os tipos de modificações químicas comumente usadas em proteínas, conforme o tipo de aminoácido.

TABELA 2- Aminoácidos laterais da cadeia disponíveis para modificações químicas.

Cadeia lateral	Modificações usadas comumente
Amino	Alquilação, acetilação
Carboxil	Esterificação, amidação
Dissulfídica	Redução, oxidação
Imidazólica	Oxidação, alquilação
Indólica	Oxidação, alquilação
Fenólica	Acetilação, substituição eletrofílica
Sulfidrila	Alquilação, oxidação
Tioéter	Alquilação, oxidação

Fonte: KESTER ; RICHARDSON, 1984.

Os reagentes reticulantes são as substâncias que promovem as alterações na cadeia lateral da proteína e, segundo Peter e Richards (1977), os mais utilizados são compostos bifuncionais simétricos de estrutura geral $x-R-x$, onde o grupo x pode ter especificidade química direta para uma classe particular de grupos funcionais na macromolécula. Porém há também os monofuncionais de estrutura $R-x$.

Dentre os reagentes bifuncionais pode-se ter a classificação de homobifuncionais, que possuem dois grupos funcionais idênticos ($x-R-x$) ou heterobifuncionais, que possuem dois grupos funcionais diferentes ($x-R-y$) (UY ; WOLD, 1977).

O radical R dos reticulantes tem grande importância, pois ele determina certas características do reagente utilizado. Segundo Uy e Wold (1977), algumas dessas características são:

- comprimento da reticulação;
- propriedades hidrofóbicas ou hidrofílicas do reagente;

- quebra da reticulação;
- especificidade de reagente e;
- introdução de um grupamento de estudo na reticulação.

Muitos são os compostos citados na literatura como reagentes reticulantes de proteínas: o grupo dos ácidos, ácido láctico e ácido tânico (KESTER; FENNEMA, 1986); os aldeídos como o glutaraldeído (CHEUNG *et al.*, 1985), o glioxal (MARQUIÈ *et al.*, 1997) e formaldeído (MARQUIÈ *et al.*, 1995); composto fenólico gossipol (MARQUIÉ, *et al.*, 1995); alginato de propileno glicol (SHIH, 1996) que reagem formando ligações cruzadas com os grupos amins das proteínas e os grupos hidroxil dos polissacarídeos (MACDOWELL, 1970); sais de cálcio (PARK *et al.*, 2001) e carbodiimida (XU *et al.*, 2003); diepóxi tais como éter diglicidil glicerol e éter diglicidil glicol (TANABE *et al.*, 2004).

O glutaraldeído, segundo Peter e Richards (1977) é um dos reagentes reticulantes mais utilizados. Ele reage com o grupo ϵ -amino da lisina, dando como produto predominante da reação a base de Schiff conjugada, conforme mostrado na Figura 8. O glutaraldeído, ao contrário do formaldeído, produz reticulação irreversível no colágeno e outras proteínas (HARLAN; FAIRHELLER, 1977).

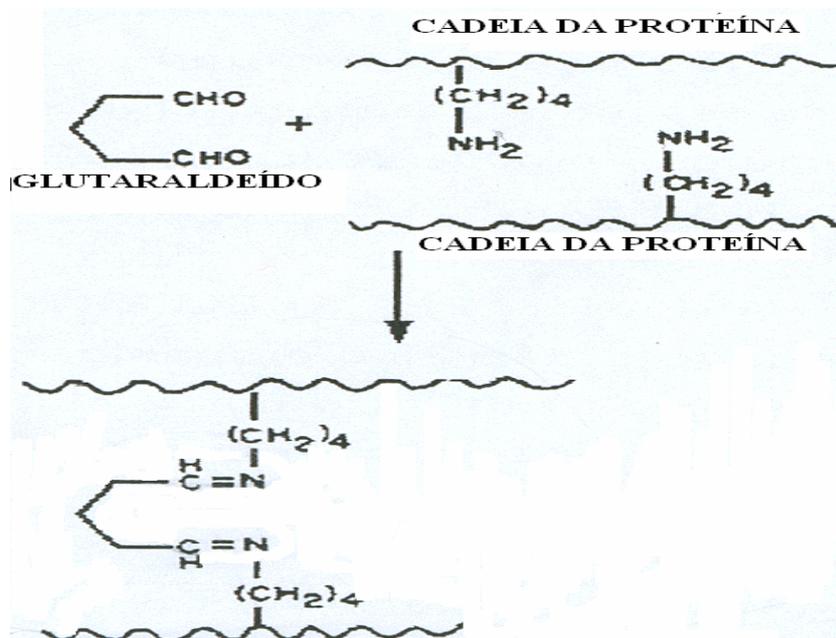


FIGURA 8 - Reação entre o glutaraldeído e a queratina. Fonte: AKIN, HARSIRC, 1995.

De acordo com Akin e Hasirci (1995), o glutaraldeído reage facilmente com a proteína à temperatura ambiente com uma mudança de coloração característica das ligações da base

de Schiff, devido à formação da ligação entre o aldeído e amina (CH=N) do grupo amino das proteínas e o glutaraldeído.

Vários estudos mostraram que a reticulação afeta a transição vítrea do material. Esta é uma transição de fase de segunda ordem que ocorre em materiais amorfos e semicristalinos, caracterizados por uma temperatura de transição vítrea (LUCAS, 2001). Acima da temperatura de transição vítrea (T_g) o material se encontra no domínio borrachoso, abaixo da T_g o mesmo está no estado vítreo. Neste estado, os movimentos moleculares estão restritos a movimentos rotacionais e movimentos de extremidades de fraca amplitude. Com o aumento da temperatura, ao ultrapassar a T_g , as cadeias de macromoléculas aumentam sua mobilidade, apresentando movimentos também translacionais. Neste ponto, as propriedades físicas e mecânicas sofrem uma forte mudança de comportamento.

Fraga *et al.*, (1984) relataram que a reticulação com formaldeído em gelatina de peixe promoveu um aumento na rigidez das cadeias de aminoácidos conduzindo a uma expansão na temperatura de transição vítrea.

Bigi *et al.*, (2001) observaram que o aumento das ligações cruzadas promovido pelo uso de glutaraldeído, aumentou a estabilidade térmica do biofilme de gelatina e conseqüentemente, um deslocamento do pico endotérmico na curva de fluxo de calor, correspondendo à temperatura de fusão.

Muños *et al.*, (2004) estudaram a reticulação de filmes ricos em glutenina utilizando glutaraldeído, glicoxal e formaldeído. Eles observaram que o aumento da T_g está associado com o efeito reticulante dos diferentes aldeídos, sendo que os biofilmes apresentaram maior resistência à ruptura e baixa alongamento e baixa mobilidade molecular.

2.7. Estudo da transferência de massa de materiais flexíveis em estado estacionário

Os biofilmes protéicos geralmente possuem boas propriedades de barreira ao oxigênio em umidades relativas (UR) baixas e intermediárias, mas apresentam uma alta permeabilidade ao vapor d'água. Esta característica está associada ao caráter hidrofílico da proteína e do plastificante adicionado (ANKER *et al.*, 2002). Os três parâmetros mais comumente utilizados na descrição da transferência de massa através de filmes são a permeabilidade, a solubilidade e a difusividade.

O fluxo de massa em estado estacionário (J_{wz}) através de um material de espessura δ , possuindo uma diferença de umidade ($X_1 - X_2$) entre suas superfícies, pode ser calculado pela lei de Fick (equação 1) (CUSSLER, 1984).

$$J_{wz} = \rho^s D_{eff} \frac{X_1 - X_2}{\delta} \quad (1)$$

onde X_1 e X_2 são as umidades em base seca (kg água /kg matéria seca) nas superfícies dos filmes, com $X_1 > X_2$, ρ^s é a massa específica do filme seco (kg matéria seca/m³), D_{eff} é a difusividade mássica efetiva da água através do filme (m²/s) e δ é a espessura do mesmo (m).

O processo de transferência de massa através do biofilme inicialmente seco, quando submetido a atmosferas com diferentes umidades relativas, ocorre em três etapas: *a)* adsorção das moléculas de vapor d'água na superfície do biofilme polimérico; *b)* movimento das moléculas de água da maior para menor concentração; *c)* desorção das moléculas de água a partir da superfície oposta do filme. Assim, o processo de transferência de massa depende de duas propriedades do material, ou seja, da afinidade do soluto e da resistência oferecida pela rede polimérica ao movimento de água no seu interior, expressa em termos de difusividade (CRANK; PARK, 1968; SOBRAL; OCUNO, 2000; LAROTONDA et al., 2005).

Em situação de equilíbrio termodinâmico, os valores de X estão relacionados com a pressão de vapor d'água (A_w) no ar atmosférico pela isoterma de sorção de vapor de água do biofilme. Normalmente, as isotermas que apresentam uma parte linear são para baixas atividades de água (A_w), e outra parte não linear, para maiores atividades de água. Já a parte linear da curva, pode-se relacionar à umidade em base seca (X) com atividade de água (A_w), pela equação 2.

$$\beta^* = \tan(\theta) = \frac{X}{A_w} \quad (2)$$

onde β^* [kg de água / kg matéria seca] é a hidrofiliicidade do material. É mais comum apresentar-se a hidrofiliicidade β em [g de água / (kg matéria seca x Pa)], o que pode ser obtido dividindo-se β^* pelo valor da pressão de saturação do vapor d'água na temperatura da isoterma, ($p_s(T)$), equação 3:

$$\beta = \frac{X}{p_s \cdot A_w} \quad (3)$$

Das equações 1 e 3, a equação que representa o fluxo de água através do biofilme em termos de diferença de atividade de água é dada pela equação 4:

$$J_{wz} = \rho^s \cdot \beta \cdot D_{\text{eff}} \left(\frac{A_{w_1} - A_{w_2}}{\delta} \right) \cdot P_s \quad (4)$$

onde o termo logo após a igualdade constitui a permeabilidade ($K^w = \rho^s \cdot \beta \cdot D_{\text{eff}}$) do biofilme polimérico ao vapor d'água, geralmente expressa em $[\text{g água} \times \text{mm}/\text{m}^2 \times \text{Pa} \times \text{h}]$.

Assim, a taxa de transferência de vapor d'água (W) através de um filme de área superficial S é dada pela equação 5.

$$W = K^w \cdot S \left(\frac{A_{w_1} - A_{w_2}}{\delta} \right) \cdot P_s \quad (5)$$

A equação 5 pode ser usada para se determinar k^w experimentalmente, a partir da variação da massa em função do tempo de uma célula de difusão (CRANK; PARK, 1968). A isoterma de sorção de umidade do filme pode ser representada pela equação de Guggenheim-Anderson-de-Boer (GAB); (MARTELLI *et al.*, 2005).

$$X = \frac{C \cdot k \cdot X_0 \cdot A_w}{[(1 - k \cdot A_w)(1 - k \cdot A_w + Ck \cdot A_w)]} \quad (6)$$

onde C e k são constantes e X_0 é o teor de umidade em base seca da monocamada molecular adsorvida no material. Por outro lado, derivando a equação 6, tem-se a hidrofiliicidade do material em função da atividade de água (equação 7) (LAROTONDA, 2005).

$$\beta = \frac{C \cdot k \cdot X_0}{P_s} \left[\frac{[-k(1 - k \cdot A_w + C \cdot k \cdot A_w) + (1 - k \cdot A_w)(-k + C \cdot k)]}{(1 - k \cdot A_w)(1 - k \cdot A_w + C \cdot k \cdot A_w)} - \frac{A_w \cdot [-k(1 - k \cdot A_w + C \cdot k \cdot A_w) + (1 - k \cdot A_w)(-k + C \cdot k)]}{[(1 - k \cdot A_w)(1 - k \cdot A_w + C \cdot k \cdot A_w)]^2} \right] \quad (7)$$

onde β^* é dado em $[\text{kg água}/\text{kg matéria seca}]$. A solubilidade β , em $[\text{kg água}/\text{kg matéria seca} \times \text{Pa}]$ pode ser obtida dividindo-se β^* por P_s (equação 8).

$$\beta = \frac{\beta^*}{P_s} \quad (8)$$

Assim, é possível determinar a hidrofiliicidade do material através da derivação do modelo de Guggenheim-Anderson-de-Boer (GAB), conhecidas as constantes do modelo a

uma dada temperatura, bem como estimar o coeficiente de difusão efetivo (D_{eff}) do material para cada situação estudada, a partir dos dados experimentais de K^w , β , ρ^s e da relação $K^w = \rho^s \beta D_{\text{eff}}$.

A permeabilidade não deve ser confundida com o transporte difusivo através dos poros. O conceito de permeabilidade está associado ao processo de solubilização e difusão do soluto, onde o mesmo se dissolve em um lado do filme e difunde através dele para o outro lado devido a um gradiente de potencial químico (DONHOWE e FENNEMA, 1994).

A permeabilidade ao vapor d'água (PVA) é a medida com que o material pode ser atravessado pelo vapor d'água. A ASTM E96-80 (1989) define a permeabilidade como a taxa de propagação de vapor d'água por unidade de área de um material plano de espessura unitária induzida por uma diferença de pressão de vapor entre duas superfícies específicas, sob condições fixas de temperatura e umidade.

Os valores de permeabilidade dos filmes poliméricos são importantes para determinar a validade de produtos embalados e para a indicar sua aplicação (MCHUGH; KROCHTA, 1994). A Figura 9 apresenta um esquema da célula utilizada na determinação gravimétrica da K^w , onde K^{w1} representa a pressão de vapor na superfície interna do filme, a qual é a mesma da superfície do dessecante e K^{w2} a pressão de vapor na superfície externa do biofilme, a qual é a mesma do interior da cuba produzida pelo cloreto de sódio.

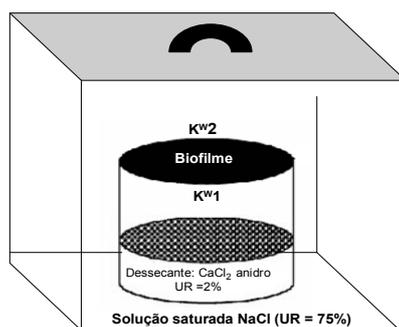


FIGURA 9 – Esquema da célula de difusão utilizada na determinação gravimétrica da K^w .

2.8 Biodegradabilidade

2.8.1 Definições

Para Chandra e Rustgi (1998) a biodegradação é um processo natural pelo qual os compostos orgânicos do meio ambiente são convertidos em compostos mais simples,

mineralizados e redistribuídos através de ciclos elementares como o do carbono, nitrogênio e enxofre. A biodegradação ocorre dentro da biosfera onde os microrganismos têm um papel principal no processo. A literatura apresenta várias definições para polímeros biodegradáveis.

Os polímeros biodegradáveis são definidos como aqueles que passam por uma quebra da cadeia polimérica por microrganismos, levando à mineralização. O amido, por exemplo, pode ser metabolizado por um grande número de organismos (LAROTONDA, 2002).

Robey *et al.* (1979) definem como polímeros naturais ou sintéticos que após sua utilização sofrem degradação pela ação específica de um ou mais componentes do meio ambiente, tipicamente enzimas secretadas por fungos e bactérias, levando a solubilização de polímeros que antes eram insolúveis em água.

Na tabela 3, Feil (1995) fornece definições de degradação, degradação biológica, degradabilidade biológica e mineralização.

TABELA 3 – Tipos de degradação

Tipos de degradações	Definições
Degradação -	Processo irreversível pelo qual o material passa por mudanças físicas, químicas, e/ou bioquímicas levando ao aumento da entropia como definido pela segunda lei da termodinâmica.
Degradação biológica	Degradação catalisada pela atividade biológica, levando à mineralização e biomassa.
Degradabilidade biológica	Extensão pela qual a degradação biológica leva à mineralização e biomassa.
Mineralização	A conversão da matéria orgânica em gases e elementos inorgânicos

Fonte: FEIL, 1995

2.8.2 Mecanismos de degradação

O meio ambiente nos quais se encontram os polímeros incluem agentes biológicos responsáveis por sua deterioração. Agentes biológicos, tais como bactérias e fungos usam a cadeia polimérica como fonte de substrato. Sob condições apropriadas de umidade, temperatura e disponibilidade de oxigênio, a biodegradação é um processo relativamente rápido (CHANDRA; RUSTGI, 1998).

2.8.3 Influência da morfologia do polímero

Macromoléculas naturais (proteína, celulose e amido), são geralmente degradadas em sistemas biológicos pela hidrólise, seguido por oxidação. A maioria dos polímeros biodegradáveis contém ligações hidrolisáveis ao longo da sua cadeia polimérica, as quais são susceptíveis a biodegradação por microrganismos e enzimas hidrolíticas. Muitas enzimas proteolíticas especificamente catalisam a hidrólise de ligações peptídicas adjacentes, para substituir proteínas, polímeros substitutos os quais contém grupos benzil, hidroxil, carboxil, metil e fenil, sendo preparados para serem introduzidos no meio dos substituintes aumentando a biodegradabilidade (HUANG *et al.*, 1978).

A morfologia do polímero, como por exemplo, a cristalinidade e a orientação das cadeias têm um papel importante na degradação. Já é bastante conhecido o fato de que a degradação de polímeros semicristalinos ocorre no mínimo em dois estágios. O primeiro estágio consiste da difusão de água nas regiões amorfas com cisão hidrolítica randômica das ligações ésteres. O segundo estágio inicia-se quando a maior parte das regiões amorfas já está degradada. Então, o ataque hidrolítico se inicia nos domínios cristalinos (HELLER, 1983; LANGER *et al.*, 1981 e LANGER, *et al.*, 1983).

Uma das maneiras mais utilizadas para caracterizar os polímeros é por meio de suas propriedades térmicas, a temperatura de fusão cristalina e a temperatura de transição vítrea, podem ser detectadas por calorimetria exploratória diferencial (DSC). A temperatura de fusão cristalina (T_m) define o ponto onde o polímero flui. Um polímero rígido, ramificado, com muitas unidades cíclicas deve possuir uma T_m alta, enquanto que uma cadeia polimérica flexível deve possuir uma T_m baixa.

2.9. Solubilidade em água e índice de inchamento

A solubilidade em água define a tolerância do material à água e é determinada pela sua estrutura química (LEE *et al.*, 2004). Os filmes ou as embalagens obtidas a partir de filmes biodegradáveis devem manter os níveis de umidade no produto embalado.

A umidade não deve se ligar ao filme ou material da embalagem e dissolvê-lo (KIM *et al.*, 2002). Desta forma, o conhecimento da solubilidade do material em água é importante para muitas aplicações. Os testes de solubilidade do material em água visam fornecer informações sobre a integridade da amostra após sua imersão em água, à temperatura e tempo específicos. O índice de intumescimento de um material também é relevante, pois está diretamente relacionado com a sua solubilidade em água.

2.10 Propriedades térmicas

As técnicas de análise térmica, como a termogravimetria (TG), termogravimetria derivada (DTG) e a calorimetria exploratória diferencial (DSC) são úteis no fornecimento de informações da estabilidade térmica de biofilmes à base de proteínas, como glúten, soja, gelatina e proteínas miofibrilares de peixe (GONTARD; RING, 1996; CHERIAN *et al.*, 1995; OGALE *et al.*, 2000; SOBRAL, 2000).

As propriedades térmicas permitem determinar a mobilidade de uma cadeia, a qual está relacionada com as características do material, como fragilidade e resistência do material. Os polímeros, pela variação térmica, podem apresentar mudanças estruturais caracterizadas pela ruptura de ligações químicas nas cadeias principais e laterais ou ainda podem sofrer uma completa degradação de sua cadeia (LUCAS *et al.*, 2001).

Na análise térmica, a termogravimetria (TG) mede o ganho ou perda de massa que ocorre na amostra pela variação da temperatura (ou do tempo à temperatura constante). Na termogravimetria derivativa (DTG), o parâmetro medido é a variação de massa em função do tempo (dm/dt) (LUCAS *et al.*, 2001).

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é outra técnica de análise térmica que permite a determinação das temperaturas de transição de fase em um polímero, como a transição vítrea (T_g) e a temperatura de fusão (T_m). A T_g se manifesta com uma mudança descontínua na capacidade calorífica (transição de segunda ordem), que é representada como uma mudança endotérmica na curva do fluxo de aquecimento do DSC (WUNDERLICH, 1981).

Para materiais semi-cristalinos, o aquecimento acima da T_g resulta no surgimento de um pico endotérmico (transição de primeira ordem) na curva do fluxo de calor, correspondendo a T_m . Os polímeros que não exibem a T_m são chamados de polímeros amorfos. Mesmos os denominados polímeros cristalinos são usualmente apenas de 20 a 50% cristalinos.

2.11 Densidade, propriedades estruturais e mecânicas

As propriedades mecânicas de um material são as características mais estudadas, pois elas implicam diretamente em sua utilização. São elas a tensão máxima de ruptura (σ em MPa), e a deformação na ruptura (ϵ em %) e o módulo de elasticidade (E em MPa). O módulo de elasticidade é uma característica de cada material, que representa a constante de proporcionalidade entre a tensão e a deformação de um corpo (VELDE; KIEKENS, 2002).

As propriedades mecânicas específicas são obtidas através da divisão das propriedades originais pela densidade do polímero (g/cm^3), são úteis, por exemplo, no caso de se utilizar biopolímeros como elemento estrutural sem o uso de outro reforço, onde as propriedades específicas determinarão as dimensões necessárias para uma desejada firmeza e resistência. A tensão máxima específica (σ^*) é dada em Nm/g e o módulo de elasticidade específico (E^*) em KNm/g (VELDE; KIEKENS, 2002).

A densidade do filme é definida como a razão entre a massa e o volume de uma amostra do mesmo, indicando o grau de compactação do filme formado e exercendo influência nas propriedades mecânicas e de barreira do biofilme. É usada no cálculo das propriedades mecânicas específicas dos materiais (VELDE; KIEKENS, 2002).

2.12. Propriedades de sorção de umidade

As isotermas de sorção de umidade descrevem a relação entre o conteúdo de umidade de equilíbrio de um material e sua atividade de água a uma determinada temperatura. A absorção/adsorção de moléculas de água na superfície ou interior de um material pode ser de natureza química ou física e a adsorção pode ocupar uma ou várias camadas (MATHLOUTHI; ROGÉ, 2003).

O estudo das isotermas de sorção de umidade é uma ferramenta importante que permite avaliar o efeito da temperatura e da umidade relativa (no equilíbrio é igual à atividade de água no material) nas propriedades dos biofilmes, uma vez que a adição ou remoção de umidade pode causar transições de fase na estrutura macromolecular (VELÁZQUES *et al.*, 2001).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentados os equipamentos, insumos e procedimentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho. Primeiramente, são descritos os procedimentos experimentais para extração de penas de aves e as análises complementares que auxiliaram na caracterização do material obtido. Numa segunda parte, o capítulo descreve os procedimentos experimentais envolvidos na obtenção dos filmes com adição de plastificante e a análise complementar para sua caracterização, enquanto a terceira parte abordará a reticulação dos filmes e posterior caracterização dos materiais obtidos. O fluxograma da Figura 10 ilustra os procedimentos utilizados neste trabalho (Figura 10).

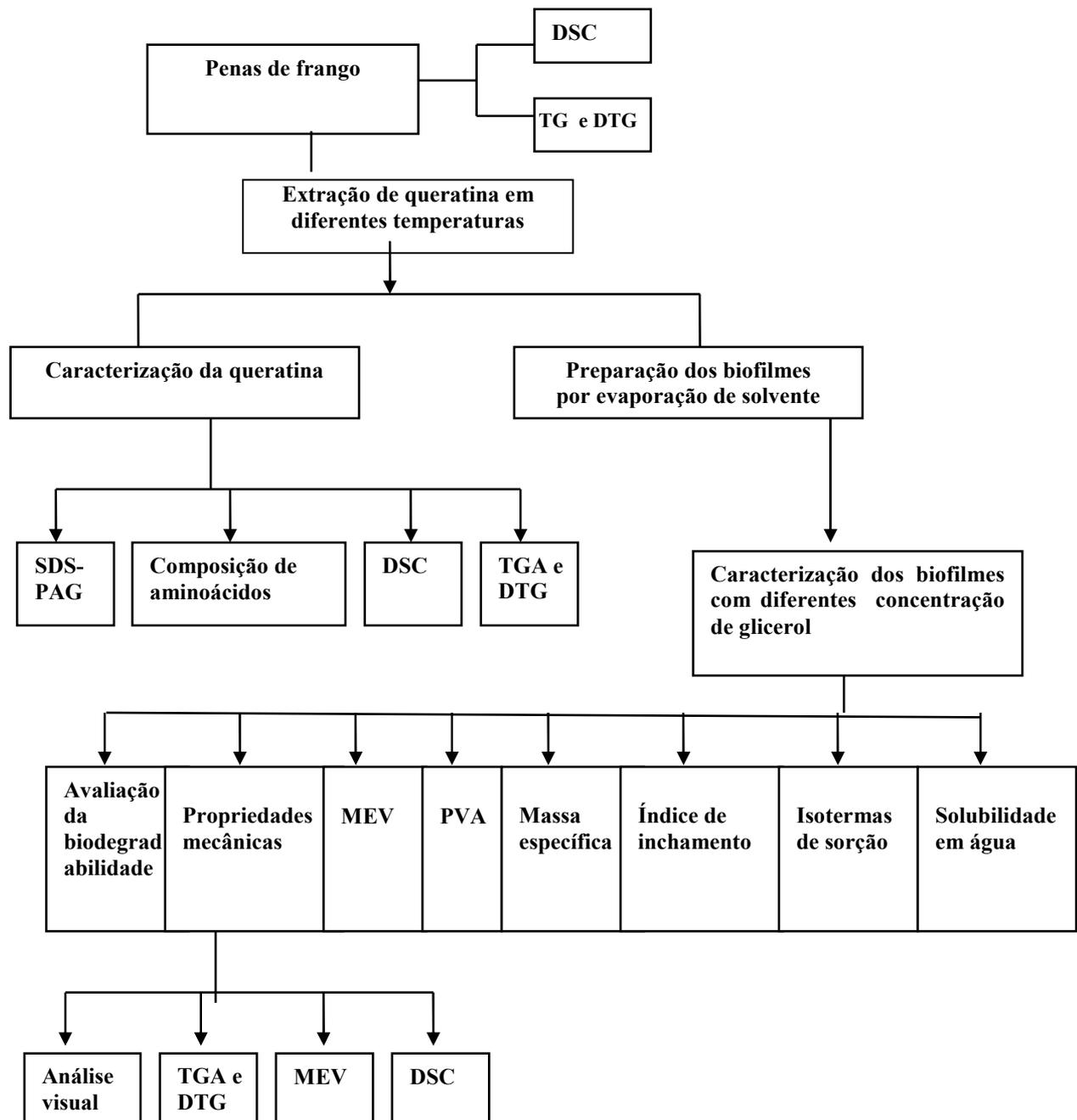


FIGURA 10- Fluxograma dos procedimentos utilizados para extração e caracterização de penas de frango para obtenção de filmes biodegradáveis.

3.1 Extração de queratina

3.1.1 Materiais

As penas de frangos foram fornecidas por uma indústria avícola local, com teor de umidade de 10%. Os reagentes utilizados para a extração de queratina foram uréia (Nuclear), 2-mercaptoetanol (Vetec), lauril sulfato de sódio (Nuclear), éter de petróleo (Nuclear) e glicerol (Nuclear). As membranas de diálise utilizadas foram da Spectra/Por-1, com ponto de corte de 8.000 a 10.000 g.mol⁻¹.

3.1.2 Limpeza das penas

As penas foram previamente lavadas segundo a norma ASTM (D584-96), secas em estufa com ventilação forçada, marca Tecnal, modelo 398/2, a 40 °C por 72h, e posteriormente, moídas em moinho de facas marca Tecnal, modelo TE-648. Este material foi desengordurado com éter de petróleo por 12h, em um extrator de *soxhlet*. Esta etapa é necessária, porque as ceras das penas dificultam a extração das proteínas pelo solvente. Os teores de umidade e gordura residual na pena foram determinados utilizando métodos clássicos da AOAC (1995).

3.1.3 Processo de extração da queratina

A solução de queratina foi preparada de acordo com o procedimento de Yamauchi (1996) com algumas modificações. Assim, 45g de penas foram imersas em 500mL de solução aquosa contendo 8 M uréia; 0,26 M de lauril sulfato de sódio e 1,66 M de 2-mercaptoetanol. A mistura foi agitada e mantida a pH 9,0 durante 1h, em atmosfera de nitrogênio e posteriormente filtrada. O filtrado foi dialisado com água destilada durante três dias consecutivos.

A influência da temperatura no rendimento no processo de extração foi analisada nas temperaturas 40, 50, 60 e 70 °C.

A dosagem de proteínas foi realizada pelo método colorimétrico do Biureto (ITZHAKI; GILL, 1964). Após a dosagem, a concentração de proteína da dispersão foi padronizada em 7 g/100 mL de solução sendo armazenada a 5 °C antes da utilização.

3.2 Caracterização da queratina

3.2.1 Determinação das massas molares de queratina por eletroforese (SDS-PAGE)

Soluções aquosas de queratina extraída foram caracterizadas por eletroforese em um gel gradiente de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). As amostras foram desnaturadas a 100 °C por 10 min no mercaptoetanol em solução tamponada de hidroximetilaminometano e ácido clorídrico (tris-HCl) 0,5 M (pH 6,8), glicerol, SDS 10 % (m/v) e azul de bromofenol 0,1 % (m/v). A separação das frações foi realizada em gel gradiente de poliacrilamida de 5 a 12 % (m/v), em placas verticais, imersas em solução tampão tris 0,025M, glicina 0,192M e SDS 0,1 % (m/v) (pH 8,3). A corrente aplicada foi de 30 mA durante 2 horas. A coloração das frações foi desenvolvida com o azul coomassie (R-250) (SAMBROOK et al., 1981) e a massa molar dos componentes da preparação de queratina foi determinada por comparação com o padrão Sigma Marker SDS-6H com massa molar entre 205.000 e 10.000 g/mol.

3.2.2 Perfil de aminoácidos

A composição dos aminoácidos da queratina de penas foi determinada após ser submetida a uma hidrólise ácida com HCl/ fenol 6 N a 110 °C por 24 horas, seguida de derivatização pré-coluna com PITC e cromatografia em coluna de fase reversa por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (WHITE *et al.*, 1986). A coluna utilizada foi do tipo PICO TAG e o modelo do equipamento foi um TSP acoplado a um software PC1000. As análises foram realizadas no Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição (DEPAN- FEA- UNICAMP).

3.2.3 Estudo da estabilidade térmica da queratina

Os experimentos de calorimetria exploratória diferencial [DSC] foram realizados num equipamento Shimadzu DSC-50, com nitrogênio como gás de purga. Foram realizadas corridas com taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ da temperatura de -50 até $200\text{ }^{\circ}\text{C}$. A aquisição de dados e a determinação de áreas parciais e integração de picos foram realizados por *softwares* que acompanham o equipamento.

Nas análises de termogravimetria (TG) e termogravimetria derivada (DTG), as massas de pequenas quantidades de amostra de queratina ou penas previamente desengorduradas (*ca.* 15 mg) foram monitoradas em um equipamento Shimadzu TGA-50 durante aquecimentos controlados com taxas de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, com nitrogênio como gás de purga. As corridas foram feitas da temperatura ambiente até $700\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3 Biofilmes de queratina de penas de frangos

3.3.1 Preparação dos filmes com plastificante

Os filmes foram preparados por evaporação de solvente, para cada filme, 60 mL de dispersão de queratina (pH 9,0) foram misturadas com glicerol em diferentes concentrações, a qual variou de 0,0 a 9 g de glicerol/ 100 g de proteína. Todas as dispersões foram preparadas com agitação mecânica constante por 15 minutos, para promover a completa homogeneização do plastificante. Após a homogeneização, cada dispersão foi espalhada em uma placa de Petri de poliestireno de $0,177\text{ m}^2$ de área. A espessura dos filmes foi controlada através do volume de dispersão colocado em cada placa de Petri. Os filmes foram secos em estufa com ventilação a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 22 h, como esquematizados na Figura 11.



FIGURA 11 – Esquema representativo do processo usado para a obtenção de filmes de queratina de penas de aves.

3.3.2 Reticulação dos filmes de queratina

Para a reticulação dos filmes foi utilizado glutaraldeído (Vetec, solução 25 %) na concentração de 1,33 % (g de glutaraldeído/100 g de queratina). Após a preparação da solução filmogênica foi adicionado o agente reticulante sob agitação de 10 minutos. Terminado esse processo, a solução filmogênica, foi espalhada sobre placas de acrílico e submetida à secagem com ventilação forçada a 35°C por 22 horas.

Os filmes de queratina reticulados foram avaliados quanto às suas propriedades mecânicas e de barreira ao vapor d'água.

3.4 Caracterização dos Biofilmes

3.4.1 Propriedades mecânicas

Os filmes foram previamente condicionados por uma semana a 35°C e umidade relativa (UR) de 75%, de acordo com a norma ASTM D882-95a (1995), antes de serem

submetidos aos ensaios de tração em texturômetro (TA-XT2i Stable Micro System, England). As propriedades mecânicas dos filmes foram avaliadas quanto à tensão de ruptura (σ), deformação na ruptura (ϵ) e módulo de elasticidade (E).

Foram utilizados corpos de prova com 25 mm de largura e 100 mm. O módulo de elasticidade foi calculado a partir da parte linear da curva tensão x deformação, entre 0,00 e 1,00 % de deformação (Figura 12). A tenacidade do material foi calculada como sendo a área abaixo da curva tensão x deformação. A separação inicial das garras foi de 70 mm e a velocidade do teste de 0,3 mm/s. As propriedades específicas foram calculadas através da divisão de cada propriedade (tensão, (E), deformação na ruptura) pela densidade específica. Cada tensão de ruptura (σ), deformação na ruptura, tenacidade e módulo de elasticidade foram à média de no mínimo 10 amostras obtidas a partir do mesmo filme. As amostras foram medidas dentro de 20 min após sua remoção da cuba de acondicionamento para minimizar os efeitos devidos à absorção/adsorção ou desorção de água.

3.4.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As micrografias das amostras dos filmes de queratina foram realizadas em diferentes concentrações de glicerol, utilizando um microscópio eletrônico de varredura (Philips XL30) com metalizador modelo P-S2 *Diode Sputtering System*, fabricado pela SI (*International Scientific Instruments*).

Para se obter a morfologia dos filmes de queratina, retirou-se fragmentos quadrados de 0,5 x 0,5 cm de cada amostra, que foram fixados com fita adesiva de carbono em suporte metálico (stubo) para MEV e submetidas à metalização em ouro, necessário por se tratar de um material polimérico. Como resultado da interação do feixe de elétrons com a superfície da amostra, uma série de radiações são emitidas e, quando captadas corretamente, fornecem informações sobre a natureza da amostra.

Para a observação da seção transversal dos filmes, bem como para perfeita manutenção de suas estruturas internas, os materiais foram cuidadosamente fraturados em nitrogênio líquido, à temperatura de aproximadamente $-160\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Estas análises foram realizadas no Laboratório de Materiais do Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Santa Catarina.

3.4.3 Permeabilidade ao vapor de água (K^w)

A K^w foi determinada de acordo com a norma ASTM E96-80 (1980). Os filmes (discos de $0,005\text{ m}^2$) foram fixados em células de difusão de alumínio contendo cloreto de cálcio previamente seco a $140\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Essas células foram condicionadas em cuba hermética contendo solução saturada de cloreto de sódio a temperatura constante de $35\text{ }^{\circ}\text{C}$. A transferência de vapor de água através da área da amostra ($0,005\text{ m}^2$) foi medida pelo ganho de massa da cápsula em função do tempo. As cápsulas foram pesadas no início e a cada 30 minutos, por um período de 12 horas, para determinar o ganho de massa devido ao gradiente de umidade relativa de 2 a 96 %. K^w foi calculada pela equação 9.

$$K^w = \frac{W \times \delta}{S \times p_s \times (A_{w1} - A_{w2})} \quad (9)$$

onde δ é a espessura média dos filmes de queratina (mm); S é área de permeação ($0,005\text{ m}^2$); a_{w1} é a atividade de água dentro da cuba; a_{w2} é a atividade de água dentro da célula; p_s é a pressão de saturação do vapor de água à temperatura do ensaio ($35\text{ }^{\circ}\text{C}$) em kPa; $W = G/t$ (g água/dia) foi calculado por regressão linear dos dados de ganho de massa da célula com o tempo em estado estacionário.

3.4.4 Massa específica (ρ)

Para a determinação da densidade específica ρ (g sólidos secos/ cm^3), a área das amostras foi fixada em 6 cm^2 com um molde e a espessura foi determinada com um micrômetro digital. Cada amostra foi mantida em uma umidade relativa de 0 % em um dessecador contendo pentóxido de fósforo (P_2O_5) por 15 dias. Após este período, as amostras foram pesadas em uma balança semi-analítica. O volume dos corpos de prova foi determinado pela equação abaixo e a densidade específica dos mesmos foi calculada através da equação 10:

$$\rho = \frac{m}{A \times \delta} \quad (10)$$

onde A é a área de cada amostra (cm²); δ é a espessura de cada amostra (cm); m é a massa seca de cada amostra (g); ρ é a densidade específica de cada filme (g/cm³).

3.4.5 Índice de inchamento

O índice de inchamento dos filmes foi determinado de acordo com o método de Rhim *et al.*, (1997). Amostras de filmes de 2 x 2 cm de dimensão foram colocadas em frascos com água destilada a 25 °C por 6 h. Em seguida, a superfície do filme foi seca com papel filtro (Whatman nº 1) por 1 min. O índice de inchamento foi determinado pelo ganho de massa da amostra após a imersão, dividido pelo conteúdo de sólidos seco inicial.

3.4.6 Isotermas de sorção

A determinação das isotermas de sorção de umidade (curvas de adsorção) foi realizada pelo método estático, com soluções salinas saturadas. A queratina foi condicionada em diferentes atmosferas obtidas com várias soluções salinas saturadas. Os sais hidróxido de sódio (NaOH), cloreto de magnésio (MgCl₂), carbonato de potássio (K₂CO₃), nitrato de magnésio (Mg(NO₃)₂), nitrito de sódio (NaNO₂), cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl) foram selecionados, de maneira a se obter umidades relativas na faixa de 6 a 96%. As isotermas foram obtidas na temperatura de 25 e 35°C. O modelo de Guggenheim-Anderson-de-Boer (GAB) (Equação 6) foi utilizado para ajustar os dados experimentais de sorção de umidade, os quais foram determinados em triplicata.

$$X = \frac{C \cdot k \cdot X_0 \cdot A_w}{[(1 - k \cdot A_w)(1 - k \cdot A_w + Ck \cdot A_w)]} \quad (6)$$

onde, C = conteúdo de água (base seca) na monocamada adsorvida, k = constante de GUGGENHEIM, associada ao calor de sorção na primeira camada, o aquecimento da sorção na primeira camada, X_n = constante associada ao calor total de sorção na multicamada, A_w = atividade de água (RH/100).

3.4.7 Solubilidade em água

A solubilidade de filmes de queratina com diferentes concentrações de glicerol foram determinadas de acordo com o método descrito por Gontard *et al.* (1992). Amostras de filme de queratina de $2 \times 2 \text{ cm}^2$ de área foram secas a $105 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h e as massas secas das mesmas determinadas por pesagem em balança analítica. Em seguida, as amostras secas foram condicionadas em UR= 75 %, obtida com solução salina de NaCl. Essas amostras foram colocadas em frascos de 30 mL de água destilada, selados com parafilme e mantidos em banho a temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 horas. Esses filmes foram novamente secos e pesados, para determinar suas novas massas secas. A diferença entre a massa seca dos filmes antes e após a imersão em água é uma medida da solubilidade dos mesmos nesse solvente. Assim, a solubilidade dos filmes em água (S_{fw}) foi determinada pela equação 11.

$$S_{fw} = \frac{\text{massa}_{\text{seca},1} - m_{\text{seca},2}}{\text{massa}_{\text{seca},1}} \times 100[\%] \quad (11)$$

3.4.8 Teste de biodegradabilidade dos filmes de queratina

Os ensaios de biodegradação foram realizados com base na norma ASTM G160-98, com modificações no tamanho das amostras sendo utilizados filmes $3 \times 3 \text{ cm}$ para ensaios de biodegradação.

O solo foi preparado com partes iguais de solo fértil (com baixo teor de argila), esterco de cavalo e areia de praia (42 *mesh*). A massa total da terra seca foi de 15 kg. Após a mistura, a terra foi peneirada com uma peneira de 4 *mesh*. A terra foi envelhecida por 3 meses e reexaminada 2 vezes por mês monitorando-se o pH (6,5 a 7,5) e a umidade (20 a 30%) (VOGELSAGER *et al.*, 2004).

Após os três meses, foi realizado um controle de viabilidade que consiste em enterrar um pano de algodão ($400 \text{ a } 475 \text{ g/m}^3$) e medir a resistência à tração após 5 dias. Havendo perda de 50% desta propriedade a terra é considerada própria para uso. Após esse período a

terra foi acondicionada em *beckers* de 1 L com cerca de 17 cm de altura (VOGELSAGER *et al.*, 2004).

O pH do solo foi monitorado periodicamente e mantido entre 6,5 a 7,5 através da adição de calcário ou enxofre para aumentar ou abaixar o pH, respectivamente. A umidade do solo foi mantida entre 20 a 30% baseada no peso seco do solo. A água perdida durante o experimento devido à evaporação foi recolocada sem deformar o solo (VOGELSAGER *et al.*, 2004).

Os *beckers* foram inseridos em um recipiente capaz de manter a temperatura em (30 ± 2) °C e a umidade entre 85 a 95 %.

Para os ensaios de biodegradação foram utilizados 10 *beckers* contendo o solo preparado. Para os filmes de queratina de pena de frango com diferentes concentrações de glicerol (0 – 0,09 g de glicerol / g de queratina) foram utilizados 2 *beckers* sendo que cada um continha 3 (três) amostras (replicatas). As amostras enterradas permaneceram no dispositivo por 3 meses, sendo removidas após 1, 2, 3, 4, 8 e 12 semanas. As amostras removidas foram cuidadosamente lavadas em água de torneira e secas em estufa a vácuo a 28°C por 24 horas. Para os ensaios foram utilizadas duas amostras, para cada composição, para cada tempo (duplicata).

As amostras foram avaliadas por análise visual , microscopia eletrônica de varredura (MEV) e termogravimetria (TG) e termogravimetria derivada (DTG), onde foram monitoradas as temperaturas de início da degradação (T_{onset}) e temperatura de taxa de degradação máxima (T_{peak}).

As curvas de TG e DTG foram realizadas em um equipamento NETZSCH – *Gerätebau GmbH Thermal Analysis Proteus* para avaliar a degradação térmica e perda de massa dos filmes de queratina. As amostras foram aquecidas de 25 a 600°C a uma taxa de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, sob atmosfera de argônio.

Os ensaios de biodegradação foram realizados no laboratório de biotecnologia da Universidade de Joinville (UNIVILLE).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Extração da queratina

O primeiro passo para a preparação de biofilmes foi desenvolver um método de solubilização de queratina que fosse eficiente e rápido. A queratina é um filamento intermediário o qual contém grandes quantidades de pontes dissulfeto e hidrogênio. Para a obtenção de queratina solubilizada de diversas fontes tais como cabelo humano, lã, penas, bicos e unhas são necessárias altas concentrações de agentes redutores e desnaturantes. Estes trabalhos mostram também que as proteínas obtidas nestas condições apresentam capacidade de formar filmes (NAKAMURA *et al.*, 2002; FUGI *et al.*, 2004; YAMAUCHI *et al.*, 1996).

As penas após serem lavadas, desengorduradas e trituradas foram agitadas durante uma hora, a 50 °C, em uma solução de pH 9,0 contendo 2-mercaptoetanol, uréia e o detergente (lauril sulfato de sódio) de modo a romper as pontes de hidrogênio e de dissulfeto das moléculas de queratina e promover sua solubilização. Estas condições permitiram obter queratina solubilizada com um rendimento de 94% em relação à massa seca inicial das penas.

Diferentes temperaturas para extração da queratina foram testadas, a fim de verificar seu efeito sobre o rendimento e na capacidade formadora de filmes. As médias dos resultados, realizados em triplicata, estão apresentados na tabela 4. Observou-se que à medida em que aumentava a temperatura de extração, diminui o rendimento efetivo do processo de extração. Isso pode estar associado à potencialização dos reagentes que, com aumento da temperatura provocou um maior número de ruptura nas ligações, resultando em moléculas de menor massa molar. Assim, supõe-se que moléculas de massa molar inferior a 8.000 g mol^{-1} possivelmente permearam a membrana de diálise ou não foram detectadas pelo método biureto, o qual detecta compostos formados a partir de duas ligações peptídicas (GORNALL 1949).

Dados da literatura mostram que em temperaturas próximas a 100 °C e condições alcalinas ocorrem a hidrólise da queratina (YAMAUCHI, 1996). Portanto, o aumento da temperatura promoveu a proteólise da proteína, diminuindo o rendimento do processo.

Nos testes de propriedades mecânicas dos biofilmes verificou-se que a solução filmogênica obtida a partir de queratina extraída a 50 °C produziu filmes com melhores propriedades mecânicas em relação às outras temperaturas de extração obtidas por ensaios preliminares.

Neste trabalho, foi estabelecido um procedimento rápido e de menor custo para extração de queratina de pena de frango em relação ao método de Yamauchi *et al.*, (1996). O tempo foi adaptado para 1 hora de extração e as concentrações dos reagentes sofreram algumas modificações como: 8 M uréia; 0,26 M de lauril sulfato de sódio e 1,66 M de 2-mercaptoetanol. A mistura foi agitada e mantida a pH 9,0 em atmosfera de nitrogênio (MOORE *et al.*, 2005). Nestas condições, obteve-se queratina de pena de frango com rendimento de aproximadamente de 94% em relação à massa seca inicial das penas, apresentando um rendimento superior em um tempo menor, enquanto que no método de extração de queratina de lã desenvolvido por Yamauchi *et al.*, (1996) levou-se 12 horas para extração de queratina com rendimento inferior.

TABELA 4 - Influência da temperatura no rendimento da extração de queratina.

Temperatura (°C)	Concentração de proteína (mg /mL) ^a X±δ
40	163,6±2,3
50	127,0±5,2
60	115,6±7,5
70	81±0

a- média de três amostras

4.2 Perfil de aminoácidos

A Tabela 5 mostra o perfil de aminoácidos da queratina extraída de penas de frangos. As análises de aminoácidos foram conduzidas após completa hidrólise da queratina na presença de ácido clorídrico 6 N a 120° C, por 6 horas. Sob estas condições, a asparagina e glutamina foram convertidas em ácido aspártico e ácido glutâmico, respectivamente. Os resultados mostram que a queratina de penas apresenta alto conteúdo dos aminoácidos sulfurados, cisteína e metionina. Também foram encontrados aminoácidos ionizáveis, ácido

aspártico (4,4%), ácido glutâmico (7,7%) e arginina (5,4%); aminoácidos não ionizáveis serina (9,3%), de prolina (8,8%), de treonina (3,5%), representando quase 40% do total do conteúdo de aminoácidos. Assim, a possibilidade de interações de glicerol na matriz da proteína, tal como ponte de hidrogênio pode ser considerada alta.

Dados da literatura mostraram que o perfil de aminoácidos da queratina de lã se assemelha com a queratina de penas, apresentando um percentual de cisteína de 8 a 9% do total de resíduos de aminoácidos (YAMAUCHI, 1996).

Estudos mostraram uma comparação da seqüência de aminoácidos de queratina de quatro espécies de aves, os quais relataram alto grau de similaridade na seqüência dos resíduos de aminoácidos da cadeia polimérica, sendo que a seqüência dos aminoácidos 80 a 97 apresentaram 82% de homologia. (ARAI *et al.*, 1983; TAKAHASHI *et al.*, 2004).

TABELA 5 - Análise da composição de aminoácido da queratina reduzida.

Aminoácidos	Resíduos por 100 (%)
Ac. Aspártico	4,73
Ac. Glutâmico	7,65
Serina	9,31
Glicina	6,18
Histidina	0,43
Arginina	5,36
Treonina	3,50
Alanina	3,56
Prolina	8,77
Tirosina	1,96
Valina	6,94
Metionina	1,30
Cisteína	7,63
Isoleucina	4,28
Leucina	7,04
Fenilalanina	4,20
Lisina	0,53

4.3 Isotermas de sorção de umidade da queratina liofilizada

Apresenta-se na figura 12 os dados experimentais de sorção de umidade da queratina liofilizada a 25 e 35°C. As curvas foram obtidas pelo ajuste do modelo de Guggenheim-Anderson-de Boer (GAB). Para as duas temperaturas estudadas, os coeficientes de correlação foram iguais a 0,99, mostrando que o modelo de GAB foi adequado para representar os dados experimentais de sorção de umidade. Os valores dos parâmetros do modelo são mostrados na Tabela 6. As isotermas de sorção de umidade da queratina, para as temperaturas de 25 e 35°C só se diferenciaram para atividades de água maiores que 0,5. Como esperado, um aumento na temperatura diminuiu os valores de umidade na monocamada. O modelo sigmoidal das curvas é típico de materiais biológicos e indica que a água é adsorvida em camadas multimoleculares.

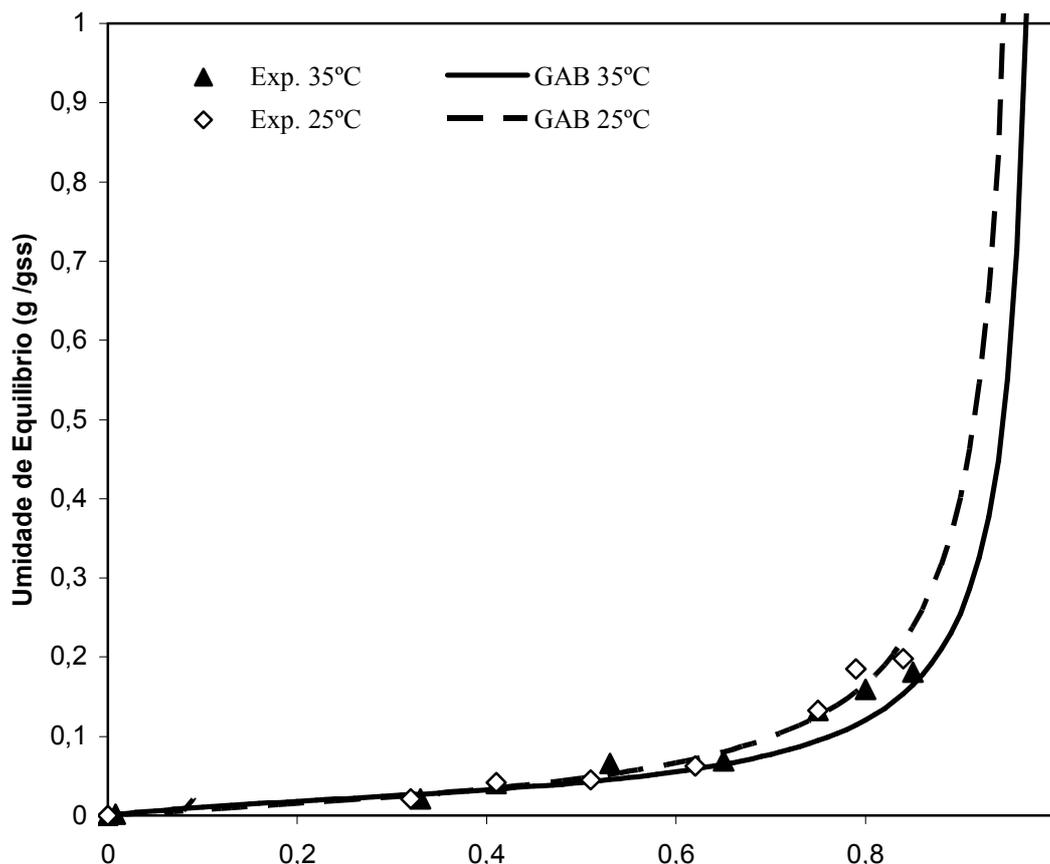


FIGURA 12 - Isotermas de sorção da queratina obtidas pelo ajuste do modelo de GAB liofilizada a 35 e 25 °C.

TABELA 6 - Valores das constantes da equação de GAB a 25 e 35°C calculados por regressão não linear.

Temperatura °C	Parâmetros ajustados para a equação de GAB			
	C	k	X ₀	R ²
35	0,0301	4,4806	1,0060	0,99
25	0,0334	2,1659	1,0223	0,99

4.4 Termogravimetria (TG) e termogravimetria derivada (DTG)

As curvas TG e DTG da pena e da queratina liofilizada apresentadas na figura 13 mostram que ambas possuem dois estágios de perda de massa, sendo que o primeiro estágio pode estar associado à perda de água adsorvida e água ligada nas moléculas e o segundo associado à degradação de proteínas de ambas as amostras. As temperaturas de início de degradação das amostras foram próximas de 100 °C, que corresponde à primeira derivada da curva de DTG. O segundo estágio de perda de massa corresponde à segunda derivada e está próximo a 300 °C para a queratina e 350 °C para a pena.

As temperaturas de início e de máxima degradação para as amostras obtidas a partir da derivada das curvas de TG, bem como as porcentagens de perda de massa são apresentadas na tabela 7. O comportamento das curvas TG deste trabalho foram semelhantes às curvas de outras proteínas como caseinato de sódio, proteínas do soro do leite e gelatina. Estas proteínas apresentaram dois estágios de perda de massa, sendo que o primeiro estágio próximo de 200 °C, relacionado com a perda de água, e o segundo entre 295 a 300 °C está relacionado com a degradação da cadeia polimérica (BARRETO *et al.*, 2003).

A análise da perda de massa das penas trituradas e da queratina liofilizada apresentou o mesmo perfil de variação de massa em função da temperatura, porém com uma diferença de 50°C a menos para a queratina liofilizada. A diminuição da estabilidade térmica da

queratina extraída deve-se, provavelmente, por ela já ter perdido parte de sua estrutura nativa durante o processo de extração. Kaminska e Sionkwsha (1999) relataram que o aquecimento de proteínas destrói sua estrutura de alfa-hélice e folhas-beta por romper as pontes de hidrogênio.

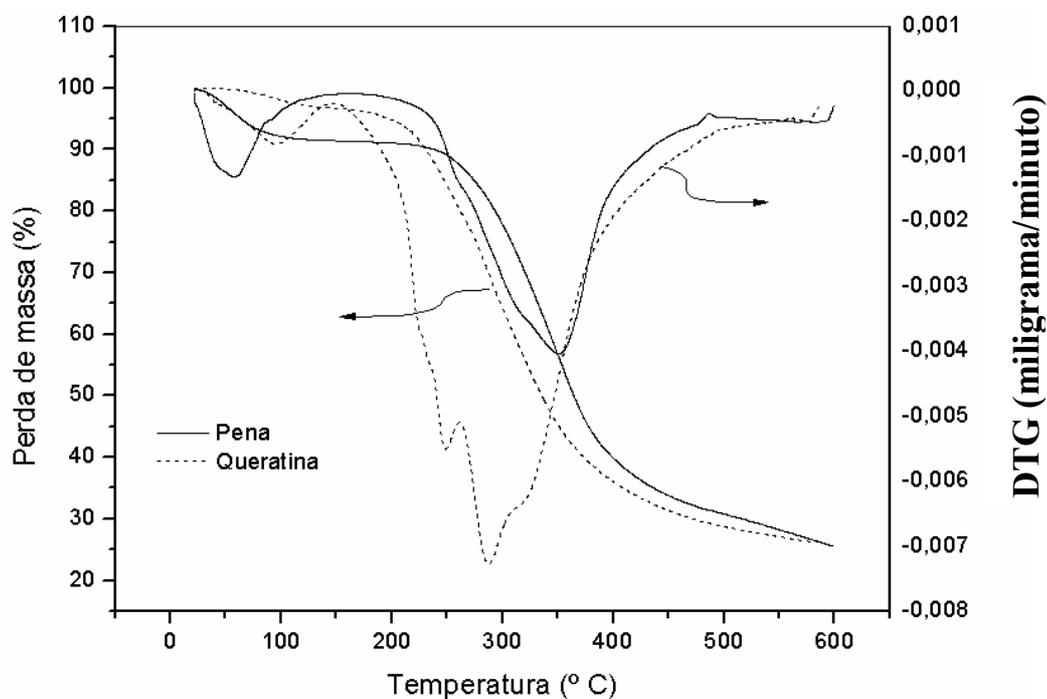


FIGURA 13 - Curvas termogravimétricas da pena e queratina extraída e liofilizada, realizadas a uma taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

TABELA 7 - Parâmetros termogravimétricos (TG) da queratina e pena de frango.

	$T_{\text{onset}}^{\text{a}}$ ($^{\circ}\text{C}$)	% de perda de massa T_{onset}	$T_{\text{máx}}^{\text{b}}$ ($^{\circ}\text{C}$)	% de perda de massa na $T_{\text{máx}}$	% Resíduo
Queratina	100	8%	300	75%	29,00
Pena de frango	50	15%	350	40%	29,00

^a Temperatura de início de degradação

^b Temperatura de degradação máxima

^c Valores determinados a $600\text{ }^{\circ}\text{C}$ a uma taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

4.5 Determinação das massas molares de queratina por eletroforese (SDS-AGE)

As soluções de queratina obtidas a diferentes temperaturas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida. Os resultados são apresentados na figura 14. As frações de peptídeos desenvolvidas no gel mostraram que as diferentes temperaturas de extração não tiveram influência sobre a massa molar média das soluções de queratina extraída. A figura 14 mostra o perfil da extração de queratina a 50 °C. As frações de peptídeos desenvolvidas no gel indicaram a presença de duas bandas entre 10000 e 17000 g mol⁻¹ e outra inferior que 10000 g mol⁻¹ sugerindo que não há peptídeos maiores e que houve uma boa solubilização da queratina na temperatura de 50 °C. Em solução de queratina de lã submetida à SDS-PAGE apresentaram dois tipos de bandas: 52 a 69 g mol⁻¹ e uma banda menor entre 14 a 30 g mol⁻¹. A literatura sugere que as bandas de alta massa molar provavelmente sejam derivadas da microfibrilas e da matriz interfilamentar da lã (YAMAUCHI, 1996).

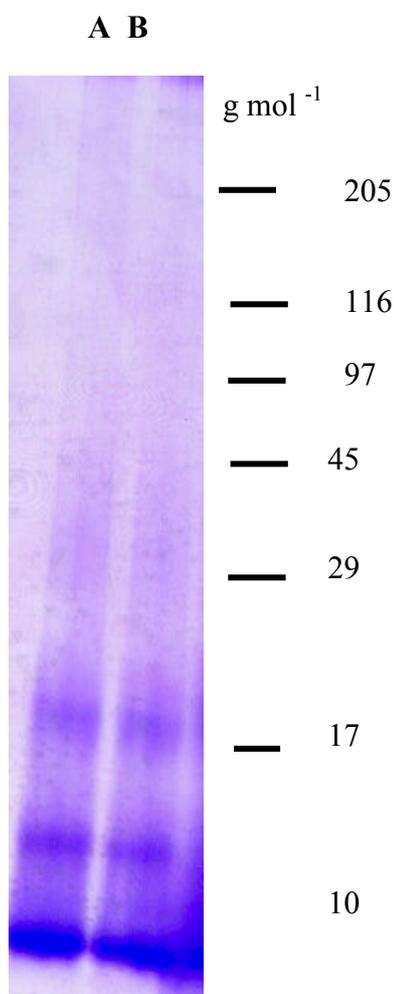


FIGURA 14 - Eletroforese em SDS-PAGE da preparação de queratina em gel gradiente de 5 a 15%. Na coluna A foram aplicados 5 μ L da preparação e em B 10 μ L.

4.6 Caracterização dos Biofilmes

4.6.1 Propriedades mecânicas dos biofilmes

Para manter a integridade e a propriedade de barreira, os biofilmes devem ser capazes de resistir ao estresse normal encontrado durante sua utilização. É desejável uma alta resistência mecânica, porém este valor deve ser ajustado de acordo com sua aplicação. O comportamento mecânico dos biofilmes depende do tipo do polímero, bem como da coesão estrutural deste.

O grau de coesão é de grande importância para as propriedades dos biofilmes e depende da estrutura química de suas macromoléculas, da presença de plastificantes e de agentes de reticulação, além da natureza do solvente usado, do método de aplicação, do processo de eliminação do solvente e da espessura do biofilme (GUILBERT, 1986).

O comportamento da tensão de ruptura dos biofilmes de queratina preparados em relação a diferentes concentrações de glicerol é mostrado na Tabela 8. A adição de 0,01 g glicerol/g de queratina reduziu a tensão de ruptura em aproximadamente 38% quando comparado com os valores encontrados para os biofilmes sem glicerol. Já os biofilmes plastificados com 0,09g glicerol/g de queratina teve o valor de tensão de ruptura reduzido em cerca de 12% quando comparado com os biofilmes sem glicerol.

Yamauchi *et al.*, (1996) relataram que biofilmes de queratina de lã plastificados com 50g glicerol/g queratina apresentaram uma tensão de ruptura entre 0,25 MPa (acondicionados em umidade relativa de 85%) e 0,15 MPa (acondicionados em umidade relativa de 65%). Deve-se observar que a de concentração de glicerol nos estudos de Yamauchi, foi maior do que no presente estudo; deve-se atentar ao fato de que as espessuras dos filmes também foram diferentes, sendo os filmes desse estudo bem mais espessos (entre 0,094 a 0,134 mm) do que os filmes citados (de 0,040 a 0,050 mm) o que deve ter influenciado na diferença dos resultados obtidos; uma vez que o aumento da matéria seca por

superfície implica num aumento superficial do número de cadeias de proteínas, conduzindo ao aumento do número de interações intermoleculares.

Apesar do aumento da concentração de glicerol diminuir a tensão de ruptura dos biofilmes, outros fatores que interferem na tensão de ruptura devem ser considerados, como por exemplo, o tempo de solubilização da queratina, a concentração de proteína da solução filmogênica, espessura do filme. No presente trabalho, utilizou-se 1 hora de solubilização, ou seja, 11 horas a menos que Yamauchi *et al.*, (1996), o que supostamente tenha mantido um número maior de pontes de sulfeto na solução formadora de filme contribuindo para o aumento da força de ruptura.

Portanto, a solução formadora de filme obtida em um menor tempo de extração apresentou filmes mais resistentes e com boa elasticidade sem a presença de glicerol.

Por outro lado, o glicerol apresentou um efeito positivo na deformação dos biofilmes que aumentou cerca de 6,3 e 18,3 vezes para os filmes preparados com 0,01 e 0,09 g glicerol /g queratina, respectivamente. Este comportamento está de acordo com a microestrutura e densidade específica do biofilme.

O módulo de Young diminuiu de 10,18 a 0,21 MPa quando 0,09 g de glicerol foi adicionado aos filmes. Esses resultados estão de acordo com outros estudos apresentados na literatura em relação à concentração de glicerol em outros biofilmes a base de proteína (PARK *et al.*, 1994; JANGCHUD *et al.*, 1999; SOBRAL, 2000).

Martelli *et al.*, (2006) relataram que a concentração de sorbitol influenciou as propriedades mecânicas dos biofilmes de queratina. A tensão máxima de ruptura foi de 0,83MPa e 0,45 MPa para amostras com 0,20 e 0,30 g sorbitol /g queratina. Esse fato era esperado, uma vez que os plastificantes têm um efeito depressor na força de ruptura dos filmes.

Filmes de queratina submetidos à modificação química com ácido iodoacético e com adição 0,20 e 0,30g glicerol/g queratina apresentaram valores na tensão de ruptura de 30MPa e 18MPa (SCHROOYEN *et al.*, 2001).

TABELA 8 - Efeito da concentração do glicerol nas propriedades mecânicas dos filmes de queratina.

Glicerol (g/ g de proteína)	Propriedades mecânicas		
	Tensão de ruptura (σ) (MPa)	Deformação na ruptura (ϵ) (%)	Módulo de elasticidade (E) (MPa/%)
0,00	16,57± 5.49	1,74 ± 0,24	10,18 ± 7,08
0,01	6,33 ± 0,67	11,86 ± 2,63	2,00 ± 0,75
0,03	7,64 ± 0,58	13,81 ± 2.36	2,11 ± 0,60
0,05	5,34 ± 0,74	19,75 ± 4,07	1,20 ± 0,21
0,07	5,41 ± 0,49	30,49 ± 7,71	0,94 ± 0,60
0,09	1,97 ± 0.19	31,92 ± 4,51	0,21 ± 0,02

A tensão de ruptura para os filmes de queratina mostrou-se superior aos filmes obtidos a partir de proteínas da soja, do amendoim, do soro de leite e do trigo (GENNADIOS *et al.*, 1994; JAGCHUD *et al.*, 1999; GUILBERT *et al.*, 1994).

Por outro lado, os filmes de queratina de pena de frango apresentaram menor tensão de ruptura do que filmes à base de proteína miofibrilar de peixe (SOBRAL, 2000).

Pesquisadores relatam que biofilmes acondicionados em ambientes com UR de 57% demonstraram maior resistência à força de ruptura, do que os filmes acondicionados em ambientes a 75% de UR. Portanto, menor a UR, mais seco estará o filme, não permitindo muita movimentação molecular da estrutura do biofilme, resultando em uma maior rigidez do

filme. Esse fato confirma o efeito plastificante da água sobre as propriedades mecânicas dos biofilmes (SOBRAL, 2000).

4.6.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Nas Figuras 15a e 15b são apresentadas micrografias obtidas por MEV que mostram detalhes da morfologia da superfície superior de filmes de queratina sem e com 0,09 g glicerol/ g proteína para um aumento de 1000 vezes. A Figura 15c mostra uma fratura do filme de queratina com 0,09 g glicerol/ g proteína.

Pode-se observar por meio das figuras 15a e 15b que a estrutura granular dos filmes analisados tornou-se mais homogênea com a presença de glicerol (g glicerol/g proteína) do que em sua ausência. A figura 15c mostra que os filmes não possuem uma estrutura interna homogênea, apresentando falhas. A homogeneidade e densidade podem ser observadas em micrografias da estrutura interna obtida por criofratura de filmes preparados com 0,09g glicerol/g de queratina. Algumas microfaturas são observadas na estrutura interna do filme as quais podem influenciar suas propriedades mecânicas.

De acordo com Martelli *et al.*, (2006), a microestrutura de biofilmes de queratina de pena sofre grande influência dependendo do plastificante utilizado em sua obtenção. Seu trabalho mostra que biofilmes de queratina como o plastificante sorbitol são mais homogêneos quando comparados com o plastificante polietilenoglicol.

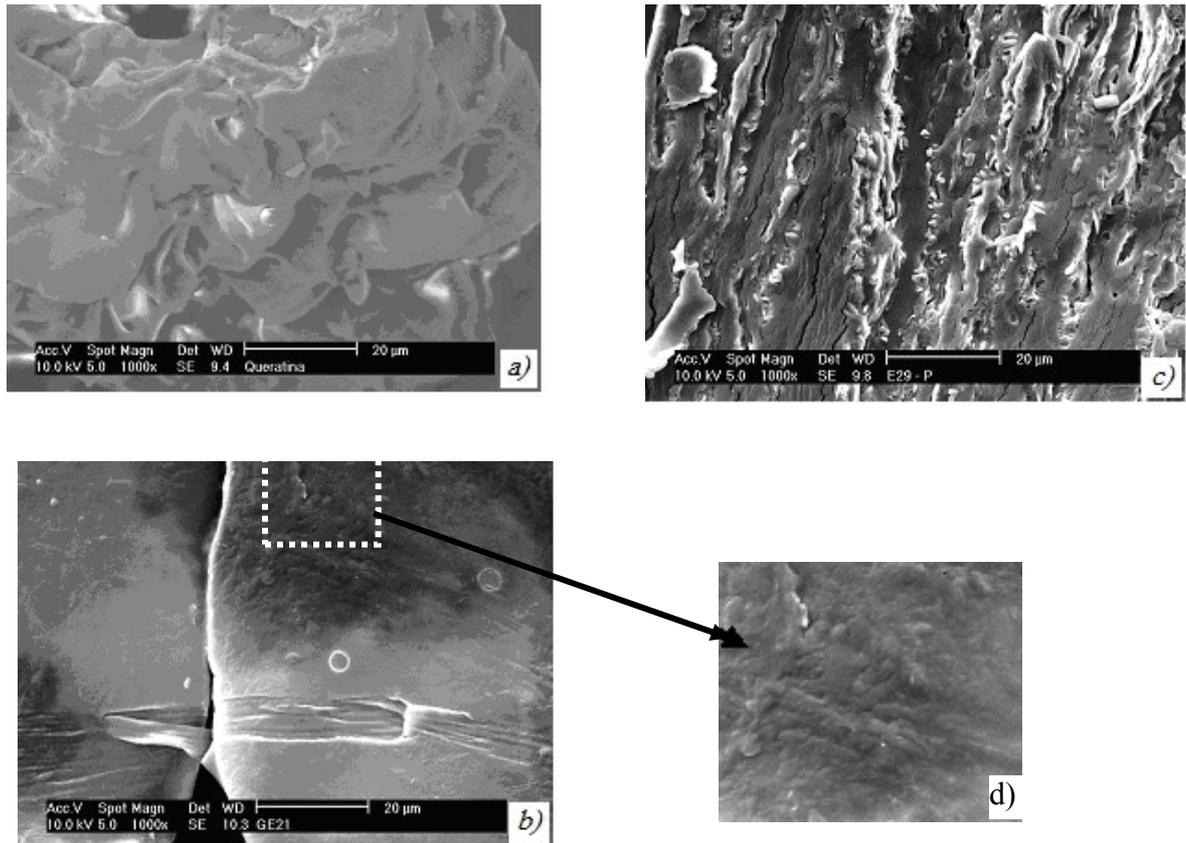


FIGURA 15- Micrografias da superfície superior de biofilmes de queratina (MEV). *a)* Superfície do filme de queratina sem glicerol; *b)* filme de queratina com 0,01g glicerol/ g proteína; *c)* criofratura do filme 0,09 g glicerol/ g proteína *d)* detalhe de *b)*.

4.6.3 Permeabilidade ao vapor de água (K^w)

A influência da concentração de glicerol nos filmes de queratina na permeabilidade ao vapor de água pode ser observado na Tabela 9. Como esperado, a K^w aumentou de 0,096 a 1,066 (g/m.s. Pa) $\times 10^{10}$ respectivamente com o aumento da concentração de glicerol, isto representa que a adição de 0,09 g glicerol/g de queratina aumentou a K^w na ordem de 1110 % quando comparado com os valores encontrados para os biofilmes sem glicerol. Por outro lado, filmes protéicos os filmes de queratina apresentaram-se bem menos permeáveis ao vapor d'água.

Comparando os filmes produzidos com 0,05g de glicerol/g de queratina e 0,05 g de sorbitol/ g de queratina, observou-se que os valores são de 0,622 e 3,150 g/m.s.Pa, respectivamente. Isto se deve provavelmente ao fato de o sorbitol ser mais hidrofílico que o glicerol, uma vez que ele possui mais grupos hidroxila em cada carbono e conseqüentemente disponibiliza mais grupos ativos para ligar-se a moléculas de água.

Baseado nas isotermas de sorção de água, os plastificantes foram classificados em grau de hidrofilicidade sendo o sorbitol maior que glicerol (GENNADIOS, *et al.*, 1994).

Comparando com outros filmes protéicos, na Tabela 9, observa-se um aumento na permeabilidade ao vapor de água com o aumento da quantidade de glicerol em filmes a base de glúten de trigo. Eles atribuíram esse aumento às modificações estruturais da rede protéica, que pode ter se tornado menos densa, bem como pela hidrofilicidade da molécula de glicerol, favorável à adsorção e desorção de moléculas de água.

Stuchell e Krochta (1994) também demonstraram que o aumento da quantidade de glicerol em filmes a base de proteína isolada de soja resultou em um aumento na taxa de permeabilidade ao vapor de água.

Portanto, mesmo os filmes produzidos com 0,30 g de sorbitol /g de queratina foram menos permeáveis do que filmes de proteínas de soja (PIS) e filmes de amido modificado (DAS) como pode ser observado na Tabela 9, onde filmes de PIS, DAS e SDS tiveram valores de K_w^a variando entre 15,0 a 28,30 g/m.s.Pa (RHIM *et al.*, 2002).

TABELA 9 – Permeabilidade ao vapor d água nos filmes de queratina com glicerol e outros filmes protéicos

Concentração de glicerol (g/g)	Espessura (mm)	K^{wa} (g/m.s.Pa)x 10¹⁰	Referências
0,01 /g queratina	0,094 ± 0,013	0,117 ± 0,000	Neste trabalho
0,03 /g queratina	0,106 ± 0,006	0,390 ± 0,008	
0,05 /g queratina	0,106 ± 0,014	0,622 ± 0,016	
0,07 /g queratina	0,134 ± 0,014	0,820 ± 0,081	
0,09 /g queratina	0,138 ± 0,012	1,066 ± 0,070	
0,00/ g queratina	0,132 ± 0,020	0,096 ± 0,006	
0,02 g sorbitol/ g queratina	0,099 ± 0,015	2,416 ± 0,053	MARTELLI <i>et al.</i> , 2006
0,05 g sorbitol/ g queratina	0,108 ± 0,009	3,150 ± 0,139	
0,10 g sorbitol/ g queratina	0,115 ± 0,123	3,647 ± 0,068	
0,20 g sorbitol/ g queratina	0,139 ± 0,020	5,167 ± 0,159	
0,30 g sorbitol/ g queratina	0,206 ± 0,032	8,098 ± 0,109	
FGT	0,127 ± 0,011	0,560 ± 0,030	GENNADIOS <i>et al.</i> , 1993
FGT/ óleo mineral	0,125 ± 0,011	0,410 ± 0,010	
FGT/sulfito de sódio	0,128 ± 0,008	0,610 ± 0,0040	
FGT/queratina hidrolisada	0,119 ± 0,009	0,430 ± 0,0030	
PIS/DAS 0%	0,067 ± 0,003	15,000 ± 0,194	RHIM <i>et al.</i> , 1998
PIS/DAS 5%	0,070 ± 0,004	16,800 ± 0,806	
PIS /DAS 10%	0,073 ± 0,005	16,500 ± 0,889	
PIS/DAS 15%	0,073 ± 0,004	15,900 ± 0,195	
PIS/DAS 20%	0,068 ± 0,006	16,100 ± 0,500	
PIS/ SDS 0%	0,072 ± 0,002	28,100 ± 1,389	RHIM <i>et al.</i> , 2002
PIS/ SDS 5%	0,084 ± 0,003	28,300 ± 2,222	
PIS/ SDS 10%	0,084 ± 0,001	23,900 ± 0,833	
PIS/ SDS 20%	0,086 ± 0,008	21,700 ± 2,500	
PIS/ SDS 30%	0,079 ± 0,002	17,800 ± 2,778	
PIS/ SDS 40%	0,083 ± 0,008	15,600 ± 1,111	

^a média de três amostras ± desvio padrão

FGT: Filme de proteína de glúten

PIS: filme de proteína isolada de soja

DAS: Amido modificado (dialdeído)

SDS: Lauril sulfato de sódio

4.6.4 Permeabilidade ao vapor de água (K^w), hidrofiliçidade (β) e coeficiente de difusão efetivo (D_{eff})

Para o estudo da hidrofiliçidade dos filmes de queratina, amostras de filmes com diferentes concentrações de glicerol foram levadas a 35 °C com diferentes gradientes de atividade de água (0,02 – 0,33; 0,33 – 0,62 e 0,62 a 0,96) para determinar os valores de k^w , como mostra a tabela 10.

TABELA 10 - Permeabilidade ao vapor d'água (K^w), hidrofiliçidade (β) e coeficiente de difusão (D_{eff}) de filmes de queratina plastificados com 0,00, 0,05 e 0,09 g glicerol/g queratina (todos dos dados de k^w foram determinados em triplicata).

A_w gradiente	Glicerol [g glicerol/g queratina]	Espessura dos Filmes (m)	G/t (g/h)	K^w_w [g.m/h.m ² .Pa]	β [g água/ g matéria seca Pa]	D_{eff} [m ² /s]
0,02-0,33			0,004	$5,1887 \times 10^{-8}$	$6,47 \times 10^{-8}$	$3,05 \times 10^{-10}$
0,33-0,62	Sem	$1,26 \times 10^{-4}$	0,012	$1,7872 \times 10^{-7}$	$1,67 \times 10^{-7}$	$4,08 \times 10^{-10}$
0,62-0,96			0,036	$4,8743 \times 10^{-7}$	$3,18 \times 10^{-6}$	$5,83 \times 10^{-11}$
0,02-0,33			0,006	$5,3617 \times 10^{-7}$	$6,85 \times 10^{-6}$	$2,36 \times 10^{-11}$
0,33-0,62	0,05	$1,26 \times 10^{-4}$	0,015	$1,3404 \times 10^{-6}$	$1,37 \times 10^{-5}$	$2,95 \times 10^{-11}$
0,62-0,96			0,048	$4,2894 \times 10^{-6}$	$5,35 \times 10^{-5}$	$2,42 \times 10^{-11}$
0,02-0,33			0,012	$5,4374 \times 10^{-7}$	$1,05 \times 10^{-5}$	$1,31 \times 10^{-11}$
0,33-0,62	0,09	$1,15 \times 10^{-4}$	0,030	$1,3593 \times 10^{-6}$	$1,92 \times 10^{-5}$	$1,79 \times 10^{-11}$
0,62-0,96			0,060	$2,7187 \times 10^{-6}$	$5,43 \times 10^{-5}$	$1,26 \times 10^{-11}$

A_w Atividade de água

G/t (g água/hora)

A adição de glicerol causou um aumento nos valores de k^w dos biofilmes de queratina. Outros plastificantes apresentaram comportamento semelhante ao glicerol (MARTELLI *et al.*, 2006; SOBRAL *et al.*, 2001). Por outro lado, o aumento da atividade de água usada para determinar o k^w provocou um aumento considerável na permeabilidade ao vapor d'água,

como mostra a tabela 10. Classicamente este comportamento pode ser explicado pelo aumento do conteúdo de umidade dos biofilmes quando altas atividades de água forem usadas. O forte efeito plastificante das moléculas de água é bem conhecido (ROUILLY *et al.*, 2001; VANIN *et al.*, 2005). Este comportamento também pode ser explicado observando o modelo de GAB, através de dois efeitos: a incorporação de glicerol aumentou a hidrofiliabilidade do biofilme, devido às moléculas de glicerol serem muito higroscópicas pela presença dos três grupos hidroxilas, as quais tem a capacidade de agregar moléculas de água; bem como a adição de glicerol nos níveis mencionados aumentou a densidade dos biofilmes de 730 a 920 e 1100 kg/m³. Não houve evaporação do glicerol incorporado nos filmes durante o procedimento de secagem (biofilmes acondicionados no dessecador com P₂O₅ por 20 dias, em temperatura ambiente) devido à alta massa específica e o ponto de ebulição do glicerol.

A baixa volatilidade do glicerol durante a secagem foi relatada por Sanches *et al.*, (1998), em pesquisas com filmes de gliadina plastificadas com diferentes componentes (glicerol e cinco polióis da série etileno glicol). O conteúdo de glicerol residual nos filmes de gliadina após a secagem foi o mesmo da solução formadora de filme, o qual foi explicado pelo alto ponto de ebulição e pela interação entre glicerol e as proteínas. Isto pode explicar o aumento da massa específica dos filmes de queratina incorporados com glicerol. Nas mesmas condições, a hidrofiliabilidade do filme aumentou respectivamente 106 e 162 vezes quando o glicerol foi adicionado nas quantidades de 0,05 e 0,09 g glicerol/ g de queratina. Entretanto, a difusividade de água nos filmes diminuiu com a adição de glicerol. Para filmes preparados com 0,05 g glicerol/ g queratina o valor de D_{eff} diminuiu cerca de 0,08 vezes, ao passo que para filmes preparados com 0,09 g glicerol/ g queratina o decréscimo do valor de D_{eff} foi cerca de 0,04 vezes.

Para o gradiente de A_w 0,02-0,33 (baixa umidade relativa do ar) a adição de 0,05 de 0,09 g glicerol/ g queratina promoveu um aumento de aproximadamente 10 vezes na permeabilidade ao vapor de água do filme.

A diminuição da difusividade pode também ser explicada pela afinidade do glicerol pela água, que envolve a molécula e diminui sua mobilidade. Para o gradiente de a_w de 0,33-0,62 o acréscimo de 0,05 ou 0,09 g glicerol/ g queratina aumentou a permeabilidade cerca de 7,5 vezes ao vapor de água no filme.

O comportamento da hidrofiliabilidade (β) dos filmes de queratina com diferentes concentrações de glicerol, em relação à atividade água estão apresentados na Figura 16. O

valor de β aumentou cerca de 82 e 115 vezes pela adição de 0,05 e 0,09 g glicerol/ g queratina no filme (figura 16).

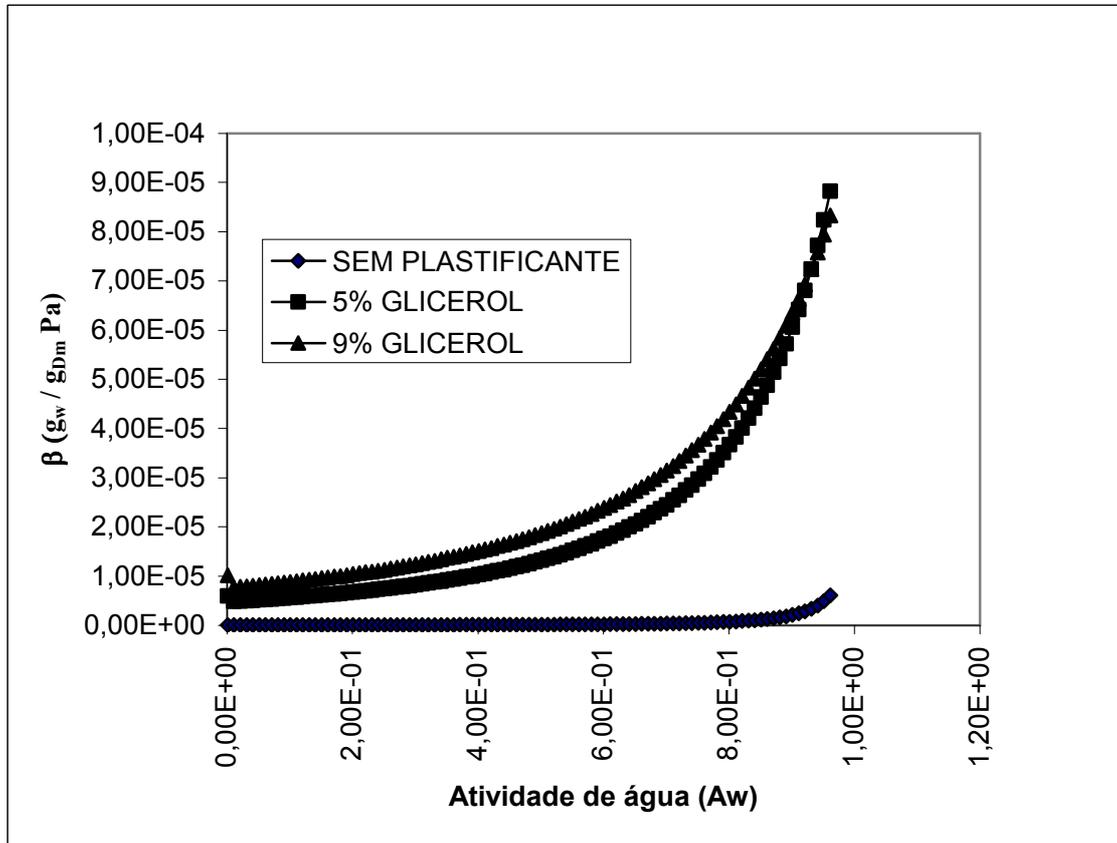


FIGURA 16 – Valores de hidrofiliicidade (β) para os filmes sem glicerol e com 0,05 e 0,09 g glicerol/ g queratina.

Os valores de D_{eff} diminuíram em aproximadamente de 0,08 e 0,04 vezes, para as duas concentrações de glicerol acima, isto é, a mobilidade de água diminuiu com o aumento da concentração de glicerol no filme. Quando a diferença de a_w utilizado no experimento foi de 0,63-0,96, a adição de 0,05 e 0,09 g glicerol/ g queratina diminuiu cerca de 0,4 e 0,2 vezes a permeabilidade de vapor de água nos filmes. Nestas mesmas condições de a_w o valor de β para os biofilmes aumentou 17 vezes para os dois níveis de adição de glicerol e os valores de D_{eff} diminuiu cerca de 0,4 e 0,2 vezes, confirmando o decréscimo da mobilidade de moléculas de água com o aumento da concentração do glicerol nos filmes de queratina. Portanto, o glicerol sempre atua aumentando a hidrofiliicidade e diminuindo o coeficiente de difusão de moléculas de água através dos biofilmes, mas o primeiro efeito, junto com o aumento do valor de ρ^s foi sempre mais importante que o segundo valor.

4.6.5 Isotermas de sorção de umidade e hidrofiliçidade (β) para os filmes de queratina

As isotermas de sorção de umidade dos biofilmes de queratina com diferentes concentrações de glicerol estão apresentadas na figura 17, pode-se observar que o modelo de GAB ajustou-se satisfatoriamente às isotermas determinadas. O modelo sigmoidal das curvas é característico de materiais biológicos e indica que a água é adsorvida em camadas multimoleculares.

Na tabela 11 apresentam-se os valores das constantes da equação de GAB determinados por regressão não linear. As isotermas mostraram claramente que o glicerol aumentou a sorção de água pelos biofilmes. Quanto maior a concentração de glicerol utilizada na dispersão filmogênica, maior a quantidade de água adsorvida por estes filmes no equilíbrio.

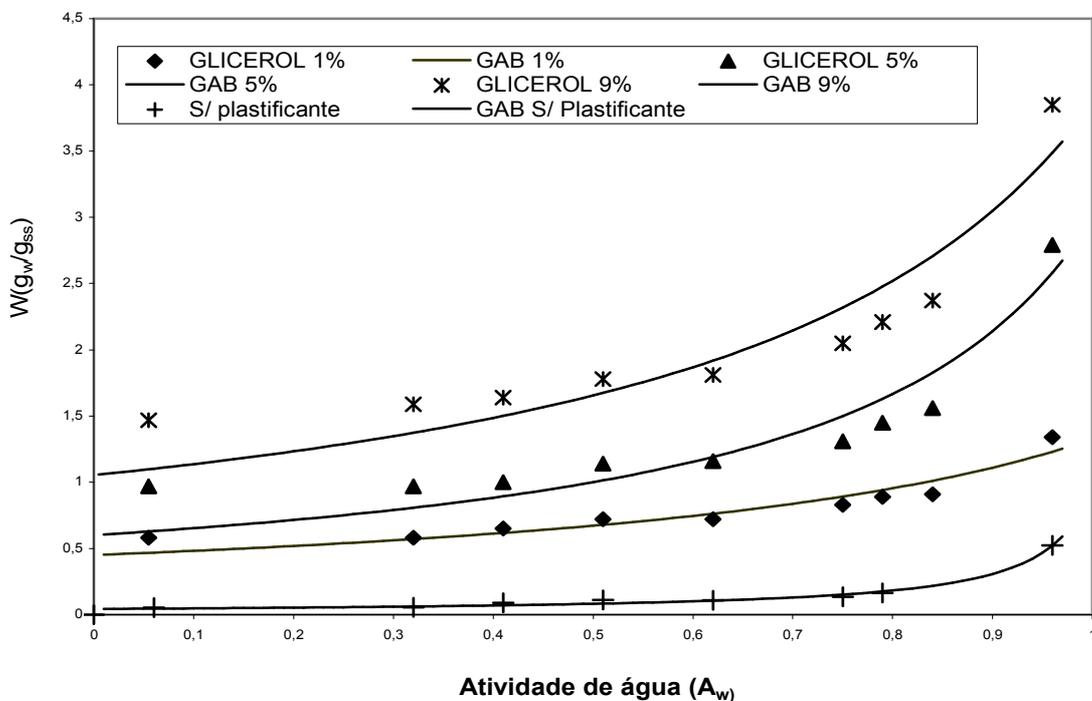


FIGURA 17 - Isotermas de sorção de umidade de filmes de queratina com diferentes concentrações de plastificante.

TABELA 11 - Valores das constantes do modelo de GAB a 35°C, para filmes de queratina com diferentes concentrações de glicerol, calculados por regressão não linear.

Glicerol (g/g de proteína)	Parâmetros GAB			
	C	k	X ₀	R ²
0,00	0,059	4,9 x10 ⁶	0,955	0,99
0,01	0,280	3,29 x10 ⁶	0,747	0,97
0,05	0,517	18,97 x10 ⁶	0,824	0,95
0,09	0,660	8,08 x10 ⁶	0,898	0,96

C - Conteúdo de água na monocamada

K – Constante de Guggenheim

X₀ - Constante associada ao calor total de sorção na multicamada

R² - Coeficiente de correlação

Martelli *et al.*, (2006) estudaram quatro modelos para ajustar a sorção de umidade dos biofilmes de queratina, sendo que o modelo GAB foi o que melhor se ajustou aos dados experimentais obtidos para uma faixa de A_w entre 0,06 a 0,97.

O modelo GAB mostra um bom ajuste para faixas amplas de atividade de água além de avaliar o conteúdo de água firmemente ligada pelos sítios de adsorção primários (ROY *et al.*, 2000). O modelo sigmoidal das curvas apresenta comportamento característico de materiais solúveis com tendência assintótica em direção ao valor de atividade de água igual a um. Os resultados da tabela 11 sugerem que o conteúdo de umidade da monocamada aumenta com a concentração de glicerol. Estes valores indicam a quantidade de água na monocamada do biofilme. A adição de plastificantes do tipo polióis, como o glicerol, aumenta o número de sítios ativos na superfície do biofilme e assim, moléculas de água podem ser adsorvidas pelos grupos hidroxila do glicerol (CHO *et al.*, 2002).

O modelo GAB também foi utilizado para comparar o efeito de diferentes plastificantes em biofilmes de queratina. Neste estudo, o glicerol apresentou também maiores valores de umidade na monocamada quando comparado ao sorbitol e ao polietilenoglicol (MARTELLI *et al.*, 2006). Isto também pode ser observado na figura 16, em que o parâmetro β indica a forte capacidade hidrofílica do glicerol.

4.6.6 Análise Termogravimetria (TG) e termogravimetria derivada (DTG)

As curvas termogravimétricas obtidas para os filmes de queratina com diferentes concentrações de glicerol são mostradas na Figura 18. Todas as curvas apresentaram comportamento semelhante, com dois estágios de perda de massa.

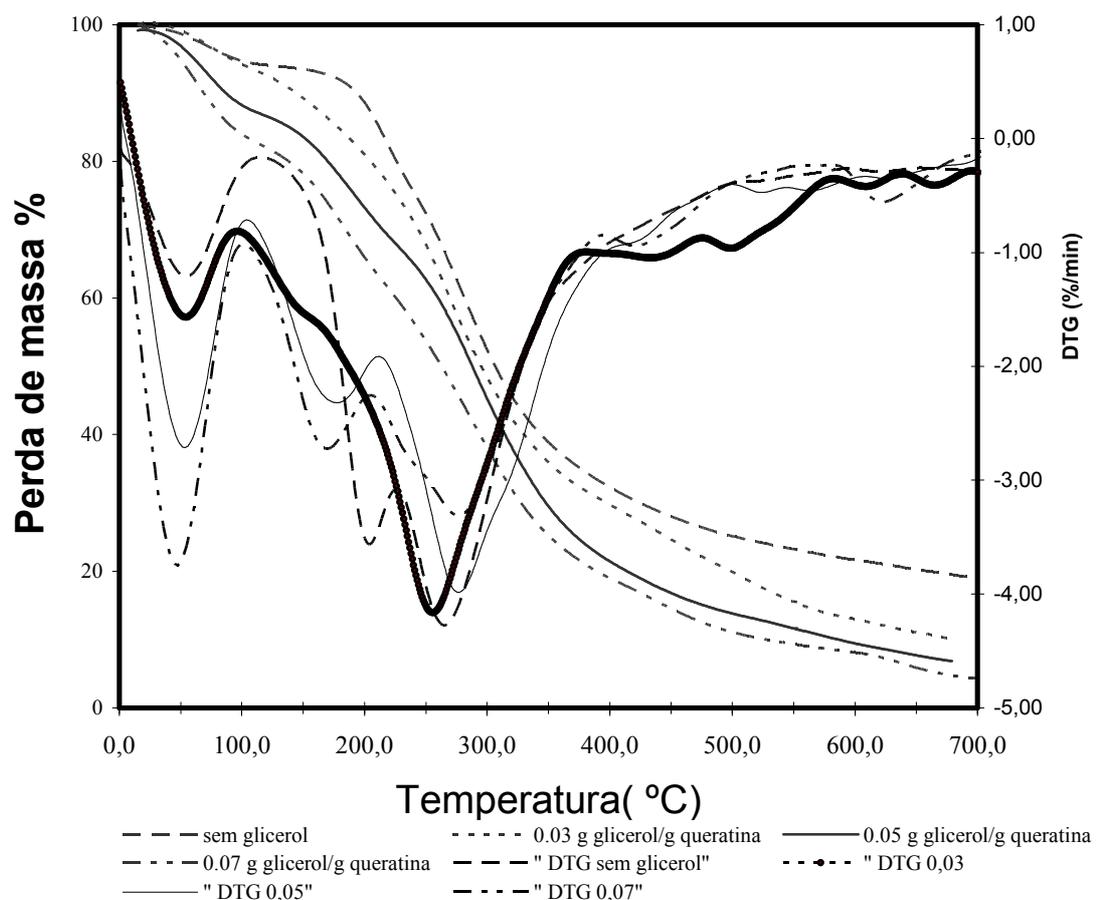


FIGURA 18 - Curvas TG para filmes de queratina com diferentes concentrações de glicerol, avaliadas a uma taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

O primeiro estágio foi iniciado quando a temperatura alcançou 50 °C e está relacionado com a perda de água pelas proteínas. O segundo estágio provavelmente esteja associado com a degradação da proteína. As temperaturas iniciais e finais de degradação dos biofilmes de queratina foram determinadas pelo cálculo das derivadas, pela evolução das temperaturas das massas das amostras em função do tempo e da temperatura da amostra, que são mostradas na tabela 12. Estes resultados mostram claramente que a adição de plastificante diminui a estabilidade térmica. A degradação dos biofilmes sem glicerol inicia-se a temperatura próximas de 200 °C, enquanto que a adição de 0,03 a 0,07 g de glicerol 1 influenciou a temperatura inicial de degradação a qual variou de 143 a 180 °C respectivamente (Tabela 12), indicando a diminuição da estabilidade térmica com o aumento da concentração do glicerol. Neste trabalho os resultados comprovam que a presença do glicerol produz um relaxamento na cadeia polimérica, diminuindo a estabilidade térmica.

Segundo Barreto *et al.*, (2003) as estruturas primárias e secundárias das proteínas não são afetadas significativamente no processo de degradação térmica em atmosfera de argônio.

TABELA 12- Dados obtidos das curvas TG e DSC para os filmes de queratina com diferentes concentrações de glicerol.

Glicerol (g/g de proteína)	T^a_{onset} (°C)	T^b_{máx} (°C)	Tg (°C)
0,00	201	467	70
0,03	180	442	67,5
0,05	147	438	64,5
0,07	143	427	56,3

^aTemperatura de início de degradação

^b Temperatura de degradação máxima

4.6.7 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A diminuição da temperatura de transição vítrea (T_g) dos filmes com o aumento da concentração de glicerol foi observada por meio de análises de calorimetria exploratória de varredura, cujos resultados são mostrados na tabela 11. A temperatura de transição vítrea (T_g) de um biofilme protéico aumenta com a rigidez das cadeias e com a intensidade das interações inter e intramoleculares das cadeias poliméricas. Nota-se que a presença do glicerol diminuiu as interações intermoleculares e como esperado diminuiu a T_g (BARRETO *et al.*, 2003; SOBRAL *et al.*, 2001, 2005).

Os valores de T_g obtidos neste trabalho implicam que os biofilmes secos estavam no estado vítreo em temperatura ambiente ($T < T_g$), a presença de plastificante aumentou a flexibilidade dos filmes. Este comportamento também foi observado por outros autores (BARRETO *et al.*, 2003; SOBRAL, *et al.*, 2001, 2005), os quais explicaram que a flexibilidade dos filmes é devido ao efeito lubrificante do plastificante.

Chen (1995) relatou que a água causa uma diminuição no valor da T_g , por diminuir o volume livre. Se um filme perde umidade gradualmente para atmosfera durante o armazenamento, até o ponto onde a T_g do filme é maior do que a temperatura ambiente, a manutenção da integridade do mesmo pode ser dificultada pelo aumento da fragilidade do filme.

A relação entre a transição vítrea, tensão de ruptura e módulo de elasticidade está apresentada na Figura 19. Os valores destas propriedades físicas diminuíram com os valores de T_g , como previamente relatado por Honary e Orafai (2002). Da mesma forma, Vanin *et al.*, (2005) observaram um aumento linear na força de ruptura quando os valores de T_g variaram de 40 a 80 °C para filmes de gelatina com glicerol.

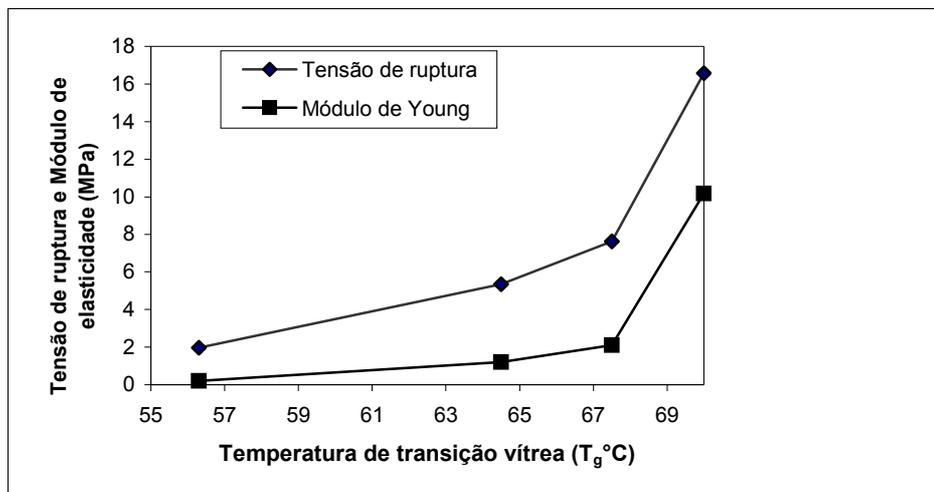


FIGURA 19 – Tensão de ruptura e módulo de elasticidade em função da temperatura de transição vítrea.

4.6.8 Solubilidade em água e índice de inchamento

A solubilidade em água dos biofilmes obtidos é mostrada na figura 20. A solubilidade em água define a tolerância do biofilme à água, a qual é determinada pela estrutura química do mesmo. O biofilme de queratina sem o plastificante apresentou 30% de solubilidade em água ao passo que a adição de 0,09g de glicerol /g de queratina elevou para 50%.

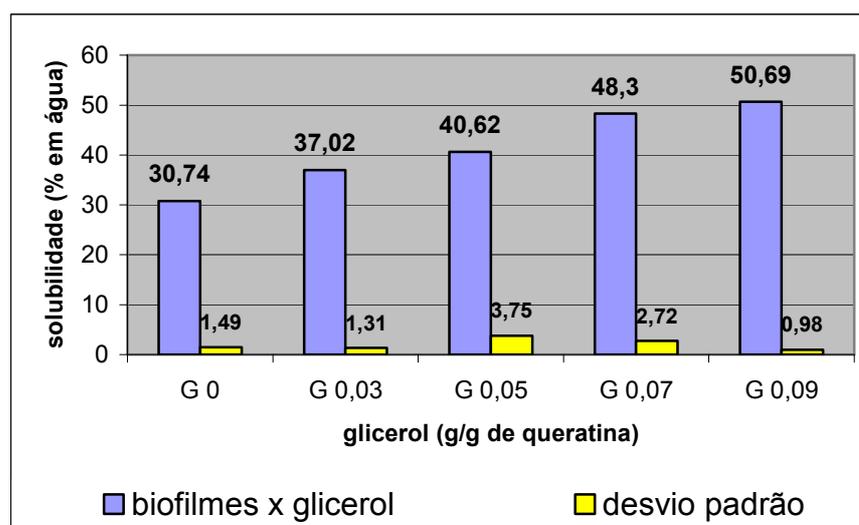


Figura 20 - Solubilidade em água para os biofilmes de queratina com diferentes concentrações de glicerol.

O biofilme de queratina sem plastificante apresentou valores de solubilidade relativamente baixos quando comparados a outros biofilmes, tais como biofilmes de celulose (55-84%) ou de carragena (41%) (RHIM *et al.*, 1997) mas maiores que de filmes obtidos de proteínas miofibrilares de peixe (12 a 20% para 30 a 70 g de glicerol/ 100g de proteína, respectivamente) (MONTERREY-QUINTERO *et al.*, 2000).

A presença de ligações covalentes intermoleculares como as pontes dissulfeto podem ser responsáveis pela insolubilidade parcial dos filmes de queratina sem plastificante. Além disso, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas podem ter contribuído para a densidade da microestrutura dos biofilmes. A solubilidade total dos biofilmes aumentou com o aumento da concentração de plastificante, sendo que a maior solubilidade foi para os biofilmes com 0,09g de glicerol/ g de queratina. Estes resultados sugerem que o glicerol evitou a formação de pontes de hidrogênio aumentando a solubilidade do filme.

O índice de inchamento dos biofilmes é mostrado na figura 21. O índice de inchamento para o filme sem plastificante foi de 155 % e aumentou para 207% com a adição de 0,07g glicerol. Já os filmes com 0,09 g de glicerol não foi possível quantificar o índice de inchamento devido a fragilidade do biofilme. Yamaushi e Yamaushi (2002) obtiveram 140 % de índice de inchamento para biofilmes de queratina de lã plastificados com 50 g de glicerol /100 g de queratina.

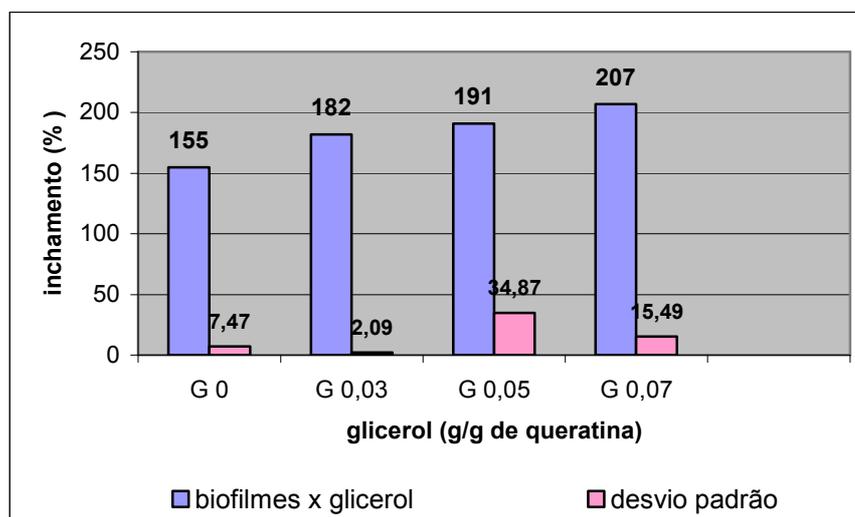


Figura 21 - Índice de inchamento para os biofilmes de queratina com diferentes concentrações de glicerol.

4.6.9 Teste de biodegradabilidade nos filmes de queratina

As figuras 22 A e B mostram o aspecto dos biofilmes antes e após serem degradados em solo. Após sete dias já se observa intensa deterioração de todas as amostras, visto que foram encontrados fragmentos menores que a amostra original no solo. A degradação foi mais acentuada em filmes com glicerol (Figura 22 B).

De acordo com Cuq *et al.*, (1998), o plastificante modifica a organização tridimensional das cadeias poliméricas, diminuindo as forças de atração intermoleculares e aumentando, assim o espaço livre e a mobilidade das cadeias deixando a moléculas mais suscetíveis à degradação biológica do que nos biofilmes sem o plastificante.

Observa-se ao microscópio eletrônico que a superfície da amostra com 0,05g de glicerol/ g de proteína, no tempo zero, apresenta-se lisa, enquanto que após sete dias foi observado um emaranhado de fibras, provavelmente devido à estrutura fibrosa da queratina (Figura 23).

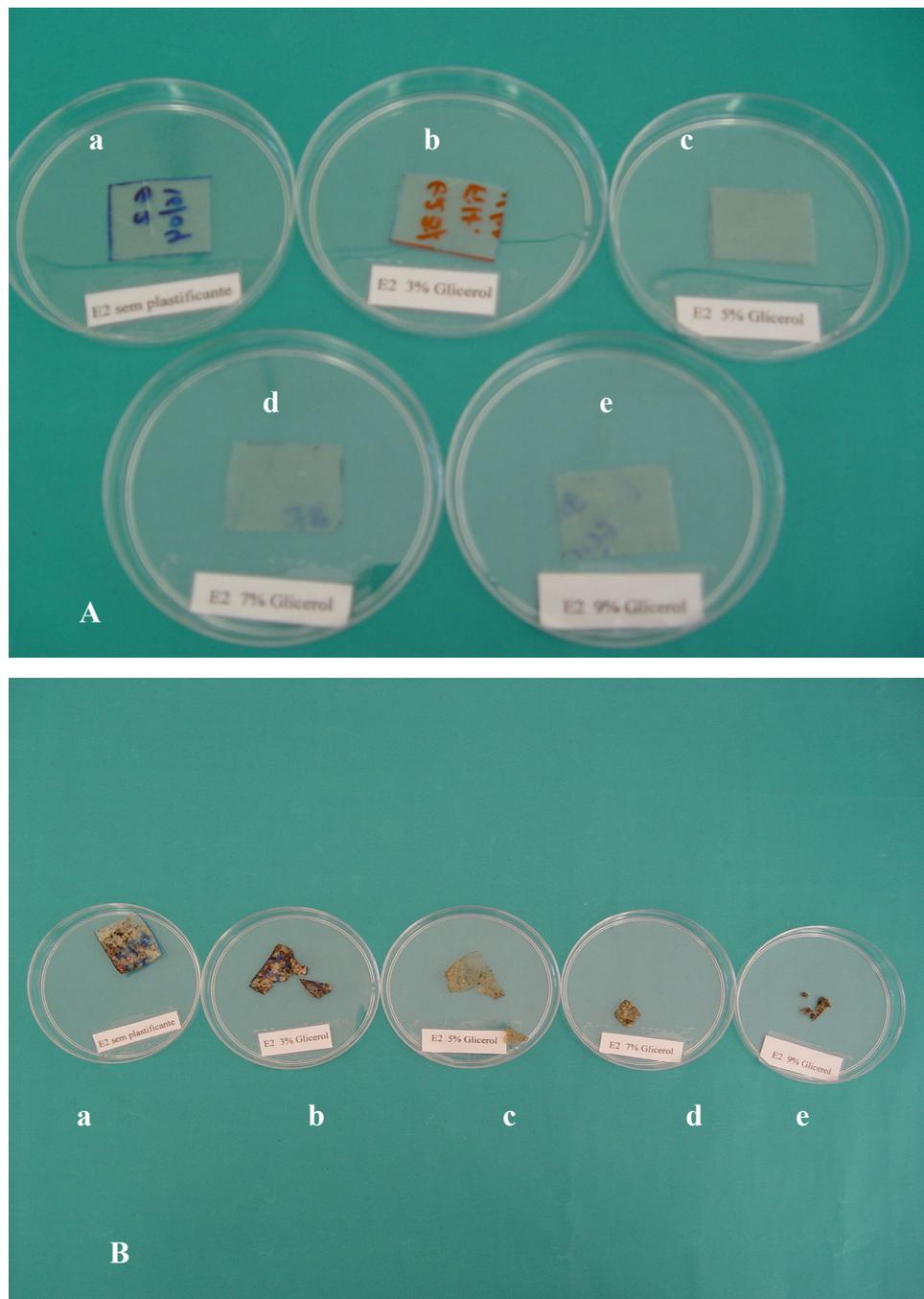


FIGURA 22 - Análise visual da biodegradabilidade dos biofilmes: A-antes da biodegradação; B- biodegradação após 7 em solo. **a)** 0 g glicerol/g proteína, **b)** 0,03 g glicerol/g proteína, **c)** 0,05g glicerol /g proteína, **d)** 0,07g glicerol/ g proteína, **e)** 0,09 g glicerol/ g proteína.

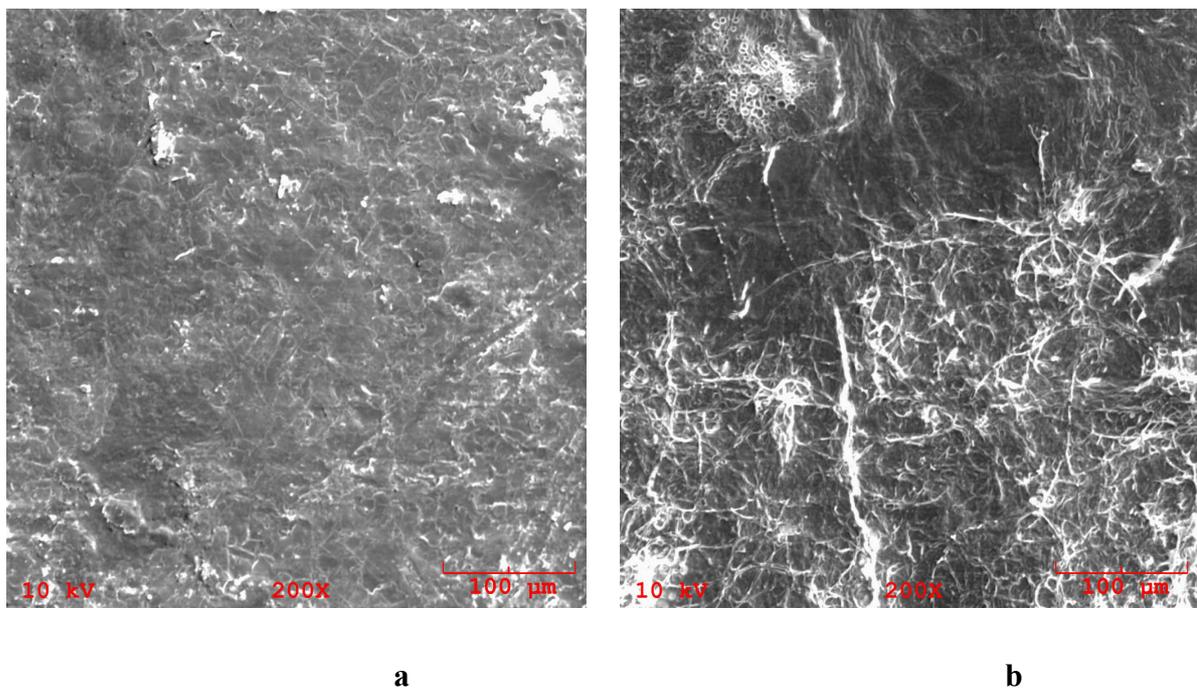


FIGURA 23- Micrografias de MEV dos biofilmes com 0,05g de glicerol/g proteína a) sem degradação e b) após 7 dias de degradação em solo (200 x).

A biodegradabilidade de biofilmes produzidos a partir de queratina de lã tendo o glicerol como plastificante foi demonstrada em estudos *in vitro* utilizando a enzima tripsina a 37°C, e observou-se que em duas semanas houve 50 a 60 % de degradação do material (YAMAUSHI *et al.*, 1996).

Comparando-se com outros filmes biodegradáveis da literatura, verifica-se que com 34 dias, o P(3HB) é completamente degradado, enquanto que com 62 dias o PCL apresenta sinais críticos de degradação (VOGELSANGER *et al.*, 2004).

4.7 Reticulação dos biofilmes com glutaraldeído

Para a reticulação dos biofilmes de queratina foi utilizado o glutaraldeído, o qual reage facilmente com o grupo amino da lisina resultando num produto de coloração amarelada que é característica das ligações da base de Schiff (AKIN *et al.*, 1995).

Em ensaios preliminares utilizando diferentes concentrações de glutaraldeído foi observado que em concentrações acima de 1,33%, os biofilmes apresentaram-se quebradiços e de difícil manuseio. Assim, a reticulação foi realizada utilizando 1,33 % de glutaraldeído.

Os biofilmes elaborados apresentaram textura homogênea, opacos com coloração ligeiramente amarelada, facilmente manuseáveis e não pegajosos (Figura 24).

Após as primeiras horas de secagem em estufa, observou-se um escurecimento gradual.

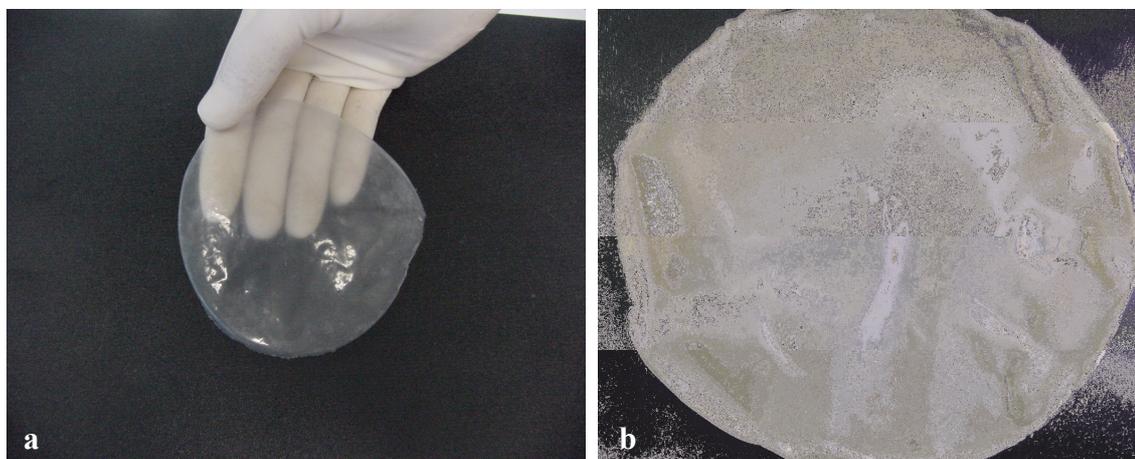


FIGURA 24 - Aspecto visual dos biofilmes de queratina. a) sem reticulante; b – com o reticulante glutaraldeído a 1,33%.

Em testes de propriedades mecânicas dos biofilmes reticulados o valor da tensão de ruptura (σ) foi igual a $4,43 \pm 0,37$ MPa, da deformação na ruptura alongamento (ϵ) igual a $0,73\% \pm 0,22$ e o módulo de elasticidade (E) $7,4 \pm 1,13$ MPa. Estas propriedades mecânicas tiveram valores inferiores do que o esperado, ou seja, menores que os biofilmes sem o

tratamento químico (Tabela 8). Isto pode ser explicado pelo fato de, apesar de se tentar realizar uma reticulação teórica de 100%, esta não abrange todas as moléculas de queratina, uma vez que o glutaraldeído reage apenas com a lisina e a queratina de pena de frango apresenta apenas 0,53% deste aminoácido (g de lisina/ g de proteína) (Tabela 5). Assim, somente uma pequena fração das moléculas reagem com o glutaraldeído, além disso, uma parte das cadeias pode sofrer reações de reticulação sem estar incorporada à rede tridimensional do biofilme.

A solubilidade destes filmes apresentou valores de $17,33\% \pm 1,52$, ao passo que para os não reticulados foi de $30,74\% \pm 1,49$, assim a reticulação reduziu sua solubilidade em água na ordem de 0,56 vezes. Os biofilmes reticulados quando submersos em água tornaram-se borrachosos e incharam, mas permaneceram com sua estrutura íntegra mesmo após 24 horas de incubação com agitação suave a 25°C .

CONCLUSÕES

Caracterização da extração de queratina

O método utilizado neste trabalho para obter queratina apresentou um rendimento de 94% de massa seca em relação à massa inicial de penas; sendo que a extração de queratina feita a 50°C resultou em filmes com melhores propriedades mecânicas e temperaturas acima desta, diminuíram o rendimento de extração de queratina. A composição de aminoácidos da queratina de pena de frango mostrou semelhança à queratina de outras espécies de aves e mamíferos.

Para as isotermas sorção avaliadas a 25 e 35°C não apresentaram diferenças e se ajustaram ao modelo GAB.

As curvas de estabilidade térmica da queratina de pena são semelhantes de outras proteínas como caseinato de sódio, proteínas do soro do leite e gelatina.

Caracterização dos biofilmes

A incorporação de plastificante ao biofilme se constatou a sua hidrofiliabilidade, sendo que o uso do parâmetro β para determinar a hidrofiliabilidade do material é muito importante para compreender o fenômeno de controle da barreira ao vapor d'água oferecido pelo biofilme. O aumento na concentração de glicerol aumentou esta propriedade principalmente devido ao aumento da solubilidade em água. A seleção apropriada do tipo de plastificante e sua concentração podem ajudar no controle do conteúdo de umidade e na permeabilidade ao vapor d'água dos biofilmes de queratina de pena.

O aumento da concentração de plastificante favoreceu a degradação dos biofilmes e esta se mostrou intensa após 7 dias.

SUGESTÕES

Embora a utilização de biofilmes apresente vantagens como menor impacto ambiental e sustentabilidade, suas aplicações industriais ainda são incipientes. A oferta de polímeros não biodegradáveis à indústria, ainda é vantajosa por serem mais econômicas e apresentarem boas propriedades funcionais. Porém, os avanços tecnológicos para a produção de biofilmes, bem como a necessidade de considerar o meio ambiente permitem predizer que os biofilmes são o futuro das embalagens na indústria. Para isso, faz-se necessário entender claramente a influência da estrutura de proteínas formadoras de filmes e suas propriedades químicas e de técnicas de formação do filme na permeabilidade, adesividade dos filmes. Estes estudos são importantes para delinear as propriedades funcionais de filmes para as diversas aplicações possíveis.

Para que os filmes de queratina sejam viabilizados são necessários testes que determinam suas propriedades de barreira de filmes reticulados com glutaraldeído.

REFERÊNCIAS

ASTM. **Standard test methods for water vapor transmission of materials**. In: Annual book of ASTM standards. Philadelphia, PA: American society for testing and materials, E 96-80. 771-778, 1989.

ASTM. **Standard test methods for tensile properties of thin sheeting**. In: Annual book of ASTM standards. Philadelphia, PA: American society for testing and materials, D 882-95a, 1995.

ASTM **Standard test methods for compostable plastics**. In: Annual book of ASTM standards. Philadelphia, PA: American society for testing and materials, G160-98, 1998.

ASTM **Standard test methods for wool content of raw wool – laboratory scale**. In: Annual book of ASTM standards. Philadelphia, PA: American society for testing and materials, D584-96, 1-5, 1996.

AOAC **Official methods of analysis of AOAC International**. 16^a edição. Washington: Association of Official Analytical Chemists, 1995.

ANDRADE, C.T.; SOUZA, T.C.R.; BARBOSA, L.C.; SILVA, K.M.P. Use of chitin as reinforcing material in biodegradable thermoplastic starch. **Natural Polymers and Composites**, v. 1, p. 218-221, 2000.

ANKER, C. A.; FOSTER, G. A.; HERMANSSON, A. M. Wheat gluten films. **U. S. Patent n°364.249**, 1972.

ANKER, M.; STANDING, M.; HERMANSSON, A. M. Relationship between the Microstructure and the Mechanical and Barrier Properties of Whey Protein Films. **Journal of Agricultural Food Chemical**, v. 48, p.3806-3816, 2002.

AKIN, H.; HASIRCI, N. Preparation and characterization of crosslinked gelatin microspheres. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 58, p. 95-100, 1995.

ARAI, K.M.; TAKAHASHI, R.; YOKOTE, Y.; AKAHANE, K. Amino acid sequence of feather keratin from fowl. **Europe Journal of Biochemmistry**, v. 132, p. 501-507, 1983.

ARVANITTOYANNIS, I. S.; BILIADERIS, C. G. Physical properties of polyol-plasticized edible films made from sodium caseinate and soluble starch blends. **Food Chemistry**, v. 62, n. 6, p. 333-342, 1998.

ARVANITTOYANNIS, I. S.; PSOMIADOU, E.; NAKAYAMA, A.; AIBA, S.; YAMAMOTO, N. Edible films made from gelatin, soluble starch and polyols, Part 3. **Food Chemistry**, v. 60, n. 4, p. 593-604, 1997.

BARONE, J.; ARIKAN, O. Composting and biodegradation of thermally processed feather keratin polymer. **Polymer Degradation and Stability**, v.92, p. 859-867, 2007.

BARRETO, P. L. M.; PIRES, A. T. N.; SOLDI, V. Thermal degradation of edible films based on milk proteins and gelatin in inert atmosphere **Polymer Degradation and Stability**, v. 79, p. 147-152, 2003.

BEPPU, M.; ARRUDA, E.; SANTANA, C. C. Síntese e caracterização de estruturas densas e porosas de quitosana. **Polímeros**, v.9, n. 4, 1999.

BIGI, A.; PANZAVOLTA, S.; RUBINI, K. Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. **Biomaterials**, v. 25, p. 4827-4832, 2002.

BIGI, A.; COJAZZIM G.; PANZAVOLTA, S.; ROVERI, N.; RUBINI, K. Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin. **Biomaterials**, v. 25, p. 4827-4832, 2002.

CARVALHO, R. M. **Desenvolvimento e caracterização de biofilmes a base de gelatina**. Campinas (SP), 1997. 128 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

CHANDRA, R; RUSTGI, R. Biodegradable Polymers. **Progress in Polymer Science**, v. 23, p. 1273-1335, 1998.

CHEN, H. Functional properties and applications of edible films made of milk proteins. **Journal of Dairy Science**, v.78, n.11, p.2563-2583,1995.

CHERIAN, G.; GENNADIOS, A.; WELLER, C. ; CHINACHOTI, P. Thermomchanical behavior of wheat gluten films: effects of sucrose, glycerin, and sorbitol: **Cereal Chemistry**, v.72, n.1, p.1-6, 1995.

CHEUNG, C. T.; NATASHA, P.; Ko, E. C; NIMNI, M. E. Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde III. Reaction with collagen in tissue. *Connective Tissue Research*, v.13, p. 109-115, 1985.

CHO, S.Y.; RHEE, C. Sorption characteristics of soy protein films and their relation to mechanical properties. **Lebensmittel Wissenschaft Und Technologie**, v. 35, p. 151-157, 2002.

CRANK, J.; PARK, G. S. Methods of measurements. In: J. Crank ; G. S. Park (Eds.) *Diffusion in polymers*. p. 1-39, London, Academic Press, 1968.

CUNHA, A. Polímeros biodegradáveis. A engenharia de polímeros e o desafio do desenvolvimento sustentado. Disponível em: < [http: www.spmateriais.pt /Univ_minho.htm/](http://www.spmateriais.pt/Univ_minho.htm/) > acesso em: março de 2005.

CUQ, B.; AYMARD, C.; CUQ, J. L.; GUILBERT, S. Edible packaging films based on fish myofibrillar proteins: formulation and functional properties. **Journal of Food Science**, v. 60, n.6, p.1369-1374, 1995.

CUQ, B.; GONTARD, N.; GUILBERT, S. Thermoplastic properties of fish myofibrillar protein: application to biopackaging fabrication. **Polymer**, v.38, n.10, p. 2399-2405, 1997.

CUQ, B.; GONTARD, N.; GUILBERT, S. Proteins as agricultural polymer for packaging production. **Cereal Chemistry**, v. 75, p. 1-9, 1998.

CUSSLER, L. E. **Diffusion, mass transfer in fluid systems**. Cambridge University Press, 1984. 525p.

DONHOWE, G; FENNEMA, O. **Edible films and coatings: Characteristics, formation, definitions, and testing methods**. In: *Edible Films and Coatings to Improve Food Quality*, p. 1-21, 1994.

FEIL, H. Biodegradable plastics from vegetable raw materials. **Agro Food Industry HiTech** Julho/Agosto, 1995.

FIÚZA, E. **Estados buscam alternativas para reduzir uso de sacolas plásticas** - Tratamento de resíduos e produção. Disponível em 06/08/2007: < <http://www.silcom.com.br/> > Acesso em: 04/09/ 2007.

FRAGA, A. N.; WILLIAMS, R. J. J. Thermal properties of gelatin films. **Polymer**. v 26, p. 113-118, 1984.

FRASER, R. D. B.; MACRAE, T. P.; SPARROW, L. G. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.10, p. 106-111, 1988.

FRASER, R. D. B.; MACRAE, T. P.; PARRY, D. A.D.; SUZUKI, E. The structure of feather keratin. **Polymer**. v.12, p. 35-56, 1971.

FRASER, R. D. B.; MACRAE, T. P. Current views on the keratin complex. **Linnean Society Symposium Series**, v.9, p. 67-86, 1980.

FUGII, T.; OGIWARA, D.; ARIMOTO, M. Convenient procedures for hair protein films and properties of alkaline phosphatase incorporated in the film. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n.1 , p. 89-93, 2004.

GENNADIOS, A.; WELLER, C. L.; TESTIN, R. F. Modification of physical and barrier properties of edible wheat gluten-based films. **Cereal Chemistry**, v.40, p.426-429, 1993.

GENNADIOS, A.; WELLER, C. L. Moisture adsorption by grain protein films. **Transactions of ASAE**. v.37, n.2, p.535-539, 1994.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means biuret reaction, **Journal Biology Chemistry**, v.177, p.751-766,1949.

GONTARD, N.; RING, S. Edible wheat gluten films: influence of water content on glass transition temperature. **Journal of Food Science**, v.44, n.11, p. 3474-3478, 1996.

GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J. L. Edible wheat gluten film: influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. **Journal of Food Science**, v. 57, p.190-199, 1992.

GUILBERT, S.; GRAILLE, J. In: Gueguen, J., Editor. Les colloques, v.71. Paris: INRA editions, p.195-206, 1994.

GUILBERT, S. Technology and application of edibles films. In: M. Mathlouthi. **Food Packaging and Preservation**. Elsevier Applied Science Publishers, NY, 1986. **XXp**.

GUILBERT, S.; GONTARD, N.; GORRIS, L. G.M. Prolongation of the shelf-life of perishable food product using biodegradable films and coatings. **Lebensmittel Wissenschaft Und Technologie**, v. 29, p. 10-17, 1996.

GUILLET, J. E.; HUBER, H. X.; SCOTT, J. **Studies of the biodegradation of synthetic plastics, in Biodegradable Polymers and Plastics**, (ed. M.Vert et al.), Royal Society of Chemistry, Cambridge, p.73-92, 1992.

HARLAN, J.; FEAIRHELLER, S. H. Chemistry of the crosslink collagen during tanning. In: **Protein crosslink: biochemical and molecular aspects**. Plenum Press. New York, 1977. 760p.

HALLEY, P. et al. Developing biodegradable mulch films from starch-based polymers. **Starch/Stärke**, v.53, p.362-367, 2001.

HELLER, J. **Use of polymers in controlled drug release, in Biocompatible Polymers, Metals and Composites**, (ed. M. Szycher), Technomic Publ. Co. Inc., Lancaster, cap.24, p.551-584, 1983.

HONARY, S.; ORAFAI, H. The effect of different plasticizer molecular weights and concentrations on mechanical and thermomechanical properties of free films. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 28, p.711-715, 2002.

HUANG, S. J.; BITRITTO, M.; LEONG, K. W.; PAULISKO, J.; ROBY, M.; KNOX, J. R., **Advance Chemistry Series**, v.169, p. 105, 1978.

IRISSIN-MANGATA, J.; BAUDUIN, G.; BOUTEVIN, B.; GONTARD, N. New plasticizers for wheat gluten films. **European Polymer Journal**, v.3, p.1533-1541, 2001.

ITZHAKI, R. F.; GILL, D. M. A micro-biuret method for estimating proteins. **Analytical Biochemistry**, v.9, p.401-410, 1964.

JANGCHUD, A.; CHINNAN, M.S. Properties of Peanut Protein Film: Sorption isotherm and plasticizer effect. **Technology**, v.32, p.89-94, 1999.

KAMINSKA, A.; SIONKWSHA, **Advanced Polymer Degradation Stability**. v.65, p. 87-90, 1999.

KATOH, K.; SHIBAYAMA, M.; TANABE, T.; YAMAUCHI, K. Preparation and Physicochemical Properties of Compression-molded Keratin Films. **Biomaterials**. v. 25, p. 2265-2272, 2004.

KELLY, R. J.; RANKIN, D. A.; RODDICK-LANZILOTTA, A. D.; BRYSON, D. G. The production of biopolymer film, fibre, foam and adhesive materials from soluble S-sulfonated keratin derivatives . **WO Patent n° 018673 A1**, 2003.

KESTER, J. J.; RICHARDSON, T. Modification of whey proteins to improve functionality. **Journal of Dairy Science**. v. 67, n. 11, p. 2757-2774, 1984.

KESTER, J. J.; FENNEMA, O. R. Water vapor permeability of edible films made with fatty acid, bilayer film. **Journal of Food Science**, v.49, p. 1482- 1485, 1986.

KIKKAWA, M. Keratin membrane. **U.S. Patent n° 4.135.942**, 1979.

KIM, K. M.; WELLER, C. L.; HANNA, M. A.; GENNADIOS, A. Heat curing of soy protein films at selected temperatures and pressures. **Lebensmittel Wissenschaft Und Technologie**, v. 35, p. 140-145, 2002.

LANGER, R. S.; PEPPAS, N. A. Chemical and physical structure of polymers as carriers for controlled release of bioactive agents: a review, **Journal Macromolecular of Science, REC. macromolecular Chemistry Physical.**, v.c23, p.61-126, 1983.

LANGER, R. S.; PEPPAS, N. A. Present and future applications of biomaterials in controlled drug delivery systems, **Biomaterials**, v.2, p. 201-214, 1981.

LAROTONDA, F. D. S.; MATSUI, K. N.; SOBRAL, P. J. A.; LAURINDO, J. B. Hygroscopicity and water vapor permeability of kraft paper impregnated with starch acetate. **Journal of Food Engineering**. v.71, p. 394-402, 2005.

LAROTONDA, F. D. **Desenvolvimento de Biofilmes a partir da fécula de mandioca.** Florianópolis (SC), 2002. 63p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Universidade Federal de Santa Catarina.

LEE, Y. K.; SHIM, J.; LEE, G. H. Mechanical properties of gellan and gelatin films. **Carbohydrates Polymers**, v.56, p.251-254, 2004.

LEITE, P. J. F.; LIMA, A. A. G.; LIMA, A. M. F.; NASCIMENTO, F. R. Poliestireno biodegradável para embalagens descartáveis: desenvolvimento da blenda pela incorporação de amido de mandioca. **TECHBAHIA Revista Baiana de Tecnologia**, v.14, n. 1, p.126-130, 1999.

LUCAS, E.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. **Caracterização de Polímeros: determinação de peso molecular e análise térmica.** Rio de Janeiro: Editora e-papers, 2001, 366 p.

MACDOWELL, R. H. New reactions of propylene glycol alginate. **Journal of Photographic Science**, v. 21, p. 441, 1970.

McHUGH, T.H.; KROCHTA, J.M. Sorbitol vs glycerol plasticizers whey protein edible films: integrated oxygen permeability and tensile property evaluation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 4, p. 841-845, 1994.

MARQUIÉ, C; AYMARD, C.; CUQ, J. L.; GUILBERT, S. Bidegradable packing mode from cottonseed flour: formation and improvement by chemical treatment wth gossypol, formalehyde and glutarldehyde. **Journal of Agricultural Chemistry**, v. 43, p. 2762-2767, 1995.

MARQUIÉ, C.; TESSIER, A. M.; AYMARD, C.; GUILBERT, S. Determination of the reactive lysine content of cottonseed protein films to monitor the extent of crosslinking by formaldehyde, glutaraldehyde and glyoxal. **Journal of Agricultural Chemistry**, v. 45, p. 922-926, 1997.

MARK, H. F.; BIKALES, N. M.; OVERBERGER, C. G. MENGES, G. **Encyclopedia of Polymer Science and Engineering**. New York: John Wiley; Sons, v.4, p. 350-395, 1985.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Segunda edição, 1999. 360p.

MARTELLI, S. M.; MOORE, G. R. P.; GANDOLFO, C. A.; PAES, S. S.; LAURINDO, J. B. Influence of plasticizers on the water sorption isotherms and water vapor permeability of chicken feathers keratin films. **Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie Science and Technology**. v.39, p. 292-301, 2006.

MATE, J. I.; KROCHTA, J. M. Comparison of oxygen and water vapor permeabilities of whey isolate and β -lactoglobulin edible films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, n.10, p. 3001-3004, 1996.

MATHLOUTHI, M.; ROGÉ, B. Water vapour sorption isotherms and the caking of food powders. **Food Chemistry**, v. 82, p. 61-71, 2003.

MATSUI, Kátia Nicolau. **Desenvolvimento de materiais biodegradáveis a partir do bagaço de mandioca**. Florianópolis (SC), 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina.

McHUGH, T. H.; KROCHTA, J. M. Sorbitol vs glycerol plasticized whey protein edible films: integrated oxygen permeability and tensile property evaluation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, n.4, p. 841-845, 1994.

MILLER, K. S.; KROCHTA, J. M. Oxygen and aroma barrier properties of edible films: a review. **Food Science and Technology**, v.8, p.228-237, 1997.

MOORE, G. R. P.; MARTELLI, S. M.; ANDREO, P. D.; GANDOLFO, C. A.; MACHADO, R. F. A.; BOLZAN, A.; LAURINDO, J. B. Obtenção de biofilmes de queratina de penas de frango. **Revista Matéria**, v.10, n.1, p. 472-478, 2005.

MOORE, G. R. P.; MARTELLI, S. M.; GANDOLFO, C. A.; SOBRAL, P. J. A.; LAURINDO, J. B. Influence of the glycerol concentration on some physical properties of feather keratin films. **Food Hydrocolloids**, v. 20, p. 975-982, 2006.

MONTERREY-Q, E. S.; SOBRAL, P. J. A. Preparo e caracterização de proteínas miofibrilares de tilápia do Nilo para elaboração de biofilmes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.179-190, 2000.

MUÑOS, P. H.; VILLALOBOS, A. C. Effect of crosslinking using aldehydes on properties of glutenin-rich films. **Food Hydrocolloids**. v.18, p. 403-411, 2004.

NAKAMURA, A.; ARIMOTO, M.; TAKEUCHI, K.; FUJII, T. A rapid extraction procedure of human hair proteins and identification of phosphorylated species. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 5, p. 569-572, 2002.

NARAYAN, R. Starch based biodegradable plastics; products – **Proceedings from Third International Symposium on Natural Polymers and Composites and Workshop Progress in Production and Processing of Cellulosic Fibres and Natural Polymers**. São Pedro (SP), 2000.

NAYAK, P. L. Biodegradable Polymers: Opportunities and Challenges. J. M. S. **Review Macromolecular Chemistry Physical**, v. 39, n.3, p. 481-505, 1999.

NEURATH, H. **The proteins: composition, structure and function**. New York: Academic Press. v. 1, ed.2, 1963. 508p.

OGALE, A. A., CUNNINGHAM, P. L.; DAWSON, J.C.; ACTON, J.C. Viscoelastic, Thermal, and Microstructural Characterization of Soy Protein Isolate Films . **Journal of Food Science**, v. 65, 4, p.672-679, 2000.

OLDENBURGER, W. **BASF aumenta a capacidade de produção do plástico biodegradável Ecoflex***. Disponível em 26/ 04/2005: < http://resbrasil.com.br/noticia_2005_21.htm> Acesso em: 04/09/ 2007.

ONIFADE, A. A.; AL-SANE, N. A.; AL MUSALLAM, A. A.; AL- ZAIBAN S. A Potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources . **Bioresource Technology**. v.66, p.1-11. 1998.

PACHIONE, R. **Biodegradável (Indústria ensaia os primeiros passos) Movimentação da indústria fortifica prognóstico positivo para o avanço do conceito no país**. Disponível em: <<http://www.plastico.com.br/revista/pm355/biodegradavel3.htm>> Acesso em: 15/03/ 2005.

PARK, S. K. RHE, C. O.; BAE, D. H.; HETTIARRACHCH, Y. Mechanical properties and water-vapor permeability of soy-protein films affected by calcium salts and clucono δ -lactone. **Journal Agricultural of Food Chemistry**. v. 49, p. 2308-2312, 2001.

PARK, H. J. CHINNAN, M. S.; SHEWFELT, R. L. Edible corn-zein film coatings to extend storage life of tomatoes. **Journal of Food Processing and Preservation**. V. 18, p. 317-331, 1994.

PEREZ, M.; KROCHTA, J. M. Dryng temperature effect on water vapor permeability and mechanical properties of whey protein-lipid emulsion films. **Journal Agricultural of Food Chemistry**, v.48, p.2687-2692, 2000.

PETER, K.; RICHARDS, F.M. Chemical cross-liking: reagents and problems in studies of membrane structure. **Annual Review Biochemistry**. v. 46, p. 523-551, 1997.

RHIM, J. H.; PARK, J. W.; JUNG, S.T.; PARK, H. J. Formation and properties of corn zein coated k-carrageenan films. **Journal of Food Science and Technology**, v. 29, p.1184-1190, 1997.

RHIM, J.; GENNADIOS, A.; WELLER, C. L.; CEZEIRAT, C.; HANNA, M. Soy protein isolated-dialdehyde starch films. **Industrial Crops and Products**, v.8, p.195-203, 1998.

RHIM, J.; GENNADIOS, A.; WELLER, C. L.; HANNA, M. Sodium dodecyl sulfate treatment improves properties of casts films form soy isolate. **Industrial Crops and Products**, v. 15, p. 199-205, 2002.

ROBEY, M.J.; FIELD,G.; STYZINSKI, M. Degradable plastics. **Materials Forum**, v. 23, p. 1-10,1989.

ROUILLY, A.; ORLIAC, O.; SILVESTRE, F.; RIGAL, L. DSC Study on the thermal properties of sunflower proteins according to their water content. **Polymer**,v. 42, p.10111-10117, 2001.

ROY, S.; GENNADIOS, A.; WELLER. C. L.; TESTIN, R. F. Water vapor transport parameters of a cast wheat gluten film . **Industrial Crops and Products**, v. 22, p. 43-50, 2000.

SABATO, S. F.; OUATTARA, B. YUH.; D' PRANOG.; LeTIENC.; MATEESCU, M.A. Mechanical and Barrier Properties of Crosslinked Soy and Whey Protein Based Film. **Journal Agricultural and Food chemical**, v.49, n.3, p.1397-1403, 2001.

SAMBROOK, J.; FRISTSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Analytical Biochemistry**, v.116, p.56-54, 1981.

SANCHES, A. C.; POPINEAU, Y.; MAGAVEL, C. LARRÉ, C.; GÉGUEN, J. Effect of different plasticizers on the mechanical and surface properties of wheat gliadin films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 46, p. 4539-4544. 1998.

SARMENTO, A. **Elaboração e caracterização de Biofilmes a partir de gelatina reticulada**. Campinas (SP), 1999. 149p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

SCHROETER, J. Creating the framework for a widespread use of biodegradable polymers (standardization, labeling, legislation, biowaste management). **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, p.377-381, 1997.

SCHROOYEN, P. M. M.; DIJKSTRA, P. J.; OBERTHUR, R. C.; 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.

SCOTT, F. T.; BLANCHARD, CH. R.; SMITH, R. A. Porous and bulk keratin biopolymers. **U.S. Patent nº 6.159.495**, 2003.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos**. São Paulo: Varela, 1996. 517p.

SHIH, L. X.; SWAISGOOD, H. E. Hydrolysis of Feather Keratin by Immobilized Keratinase. **Applied Environment Microbiology**. v. 62, n. 11, p. 4273-4275, 1996.

SOBRAL, P. J. A.; SANTOS, J. S.; GARCIA, F. T. Effect of protein and plasticizer concentrations in film forming solutions on physical properties of edible films based on muscle proteins of a Thai Tilapia. **Journal of Food Engineering**, v. 70, n. 1, p.93-100, 2005.

SOBRAL, P. J. A.; MENEGALLI, F. C.; HUBINGUER, M. D.; ROQUE, M. A. Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. **Food Hydrocolloids**, v. 15, p. 423 – 432. 2001.

SOBRAL, P. J. A.; OCUNO, D. Permeabilidade ao Vapor de Água de Biofilmes a Base de Proteínas Miofibrilares de Carne. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 3, p. 11-16, 2000.

SOBRAL, P. J.A. **Proteínas de origem animal na tecnologia de biofilmes**. Pirassununga (SP), 2000. 158p. (Tese de Livre-Docência). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

SOTERO, A. P. Plásticos biodegradáveis trazem melhoria ambiental. Disponível em: <<http://www.uniemp.br/labjor/newsagosto2000.htm#Plásticosbiodegradáveis>> - v. 5 , p. 1-9, 1996. Acessado em 12/09/2005.

SOUZA, S.M.A. **Elaboração e caracterização de filmes comestíveis biodegradáveis a base de proteínas miofibrilares bovina**. Campinas (SP) , 2001. 207p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

STUCHELL, Y. M.; KROCHTA, J. M. Enzymatic treatments and thermal effects on edible soy protein film. *Journal Food of Science*, v. 59,n.6, p. 1332-1337,1994.

TAKAHASHI, K; YAMAMOTO, H.; YOKOTE, Y.; HATTORI, M. Thermal behavior of fowl feather keratin. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v.68, n. 9, p. 1875- 1881, 2004.

TANABE, T.; OKITSU, N.; YAMAUCHI, K. Fabrication and characterization of chemical crosslinked keratin films. **Materials Science and Engineering** , v.24, p.441-446, 2004.

TANABE, T.; OKITSU, N.; TACHIBANA, A.; YAMAUCHI, K. Preparation and characterization of keratin-chitosan composite film. **Biomaterials**, v. 23, p. 817-825, 2002.

THARANATHAN, R. N. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. **Food Science e Technology**, v. 14, p. 71-78, 2003.

UY, R.; WOLD, F. Introduction of artificial crosslink into proteins. In: **Protein crosslink: biochemical and molecular aspects**. Plenum Press. New Yorl, 1977. 760p.

VELDE, V. K.; KIEKENS, P. Biopolymers: overviewf several properties and consequences on their applications. **Polymer Testing**, v.21,p.433-442, 2002.

VANIN, F. M., SOBRAL, P. J. A., MENEGALLI, F. C., CARVALHO, R. A., HABITANTE, A. M.Q. B. Effects of plasticizers and their concentrations on thermal and functional properties of gelatin-based films. **Food Hydrocolloids**. v. 19, p. 899-907, 2005.

VELÁZQUEZ G.; TORRES, J.A.; MARTÍN-POLO, M.O. Temperature effect on the moisture sorption isotherms for methylcellulose and ethylcellulose films. **Journal of Food Engineering**, v. 48, p. 91-94, 2001.

VOGELSANGER, N. J., FURLAN, S. A; SCHNEIDER, A. L. S; PIRES, A. T. N; PEZZIN, A. P. Blendas biodegradáveis de poli(3-hidroxibutirato) e poli(ε-caprolactona): obtenção e estudo da miscibilidade. **Materials Research**., v.6, n.3, p.359-365, 2004.

WALL, J. S.; BECKTWITH, A.C. Relationship between structure rheological properties of gluten proteins. **Cereal Science Today**, v.14, n.1, p.16-17, 1969.

WELLER, C. L.; GENNADIOS, A.; SARAIVA, R. Edible bilayer films from zein and grain sorghum wax or carnauba wax. **Lebensmittel Wissenschaft Und Technologie**, v.31, p. 279-285, 1998.

WOODIN, A.M. Molecular size, shape and aggregation of soluble feather keratin. **Biochemical Journal**, v. 57, p. 99-109, 1954.

WUNDERLICH, B. **Macromolecular Physics**. V.3- Crystal Melting. Academic Press 1981.

XU, J. B. BARTLEY, J. P. JOHNSON, R.A. Preparation and characterization of alginate-carrean hydrogel films crosslinked using a water-soluble cadamide (WSC). **Journal Membrane Science**. v. 218, p. 131-146, 2003.

YAMAUCHI, K.;YAMAUCHI, A.; KUSUNOKI, T.; KOHDA, A.;KONISHI,Y. Preparation of stable aqueous solution of keratins, and physiochemical and biodegradational properties of films. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 31, p. 439-444. 1996.

YAMAUCHI, A.; YAMAUCHI, K. **Formation and properties of wool keratin films and coatings**. In: Protein-Based Films and Coatings. CRC Press, p. 253-273, 2002.

ANEXO I



Influence of the glycerol concentration on some physical properties of feather keratin films

Geovana Rocha Plácido Moore^a, Sílvia Maria Martelli^a, Cristhiane Gandolfo^a, Paulo José do Amaral Sobral^b, João Borges Laurindo^{a,*}

^aDepartment of Chemical and Food Engineering, Federal University of Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

^bFood Engineering Department (ZEA-FZEA), University of São Paulo, 13635-900 Pirassununga, SP, Brazil

Received 13 October 2005; accepted 17 November 2005

Abstract

The influence of glycerol concentration on some physical properties such as the thermal, mechanical, water solubility, hydrophilicity and water barrier properties of feather keratin films was studied. Feather keratin was extracted with an aqueous solution of urea, 2-mercaptoethanol and sodium dodecyl sulphate (SDS) at 50 °C and pH 9.0. Film-forming solutions were prepared with 7 g keratin/100 ml, adding glycerol at level concentrations of 0.01, 0.03, 0.05, 0.07 and 0.09 g glycerol/g keratin. The films tensile strength decreased from 16.6 ± 5.5 to 2.0 ± 0.2 MPa and the elongation at break increased from $1.7 \pm 0.7\%$ to $31.9 \pm 4.5\%$, while the water vapor permeability of keratin films increased from 5.19×10^{-8} to about 10^{-6} g/m² h Pa for samples without plasticizer and prepared with 0.09 g glycerol/g keratin, respectively. Films solubility was also increased from 0.307 to 0.507 g/g of initial dry matter when 0.09 g glycerol/g keratin was added. The use of the hydrophilicity concept was very useful to understand the phenomena controlling the water vapor barrier offered by the film, and can be useful as a procedure to investigate this phenomenon in other situations.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Chicken feathers; Protein; Biodegradable films; Plasticizer; Functional properties

1. Introduction

Nowadays there is an increasing interest in the development of materials that are environment friendly, obtained from renewable resources. The main renewable materials are obtained from polysaccharides, lipid and proteins (Irissin-Mangata, Bauduin, Boutevin, & Gontard, 2001). Proteins are polymers formed by various amino acids capable of promoting intra- and inter-molecular bonds, allowing the resultant materials to have a large variation in their functional properties (Jangchud & Chinnan, 1999).

In the last 15 years, poultry production increased by about 5% annually, mainly in developing countries. Feathers are an important waste disposal of poultry industry and are composed basically of structural proteins, the keratins, which have a great ability to form films (Schrooyen, Dijkstra, Oberthür, & Bantjes, 2001b). It is

known that the stability of the keratin in the solid state is due to cross-linking produced by the formation of cystine disulphide bonds, hydrogen bonds and salt linkages (Woodin, 1954). The addition of reagents that break these bonds decreases the strength of the fibers. Therefore, it is possible to dissolve keratin using solvents that break the –S–S– bonds and the hydrogen bonds (Schrooyen, Dijkstra, Oberthür, Bantjes, & Feijen, 2000, 2001a; Woodin, 1954).

To obtain a stable dispersion of extracted keratins in the absence of a reducing and disruptive agent, it is interesting to use sodium dodecyl sulfate (SDS). This surfactant forms a complex with the keratin and prevents extensive protein aggregation during the dialysis procedure for removal of reducing and disruptive agents (Schrooyen et al., 2000, 2001a; Yamauchi, Yamauchi, Kusunoki, Kohda, & Konishi, 1996).

Thus, it is possible to develop biodegradable materials based on keratin, such as films, by casting. Ideally, the regeneration of disulfide bonds in these materials during

*Corresponding author. Tel.: +55 48 3319930; fax: +5548 3319687.
E-mail address: jono@enq.ufsc.br (J. Borges Laurindo).

the drying of film-forming dispersion may be used as a method to impart water insolubility and good mechanical properties to resultant keratin materials. However, proteins form brittle films without the addition of plasticizing compound, such as polyols. Plasticizers decrease inter- and intra-molecular attractive forces and increase chain mobility, improving film flexibility (Sánchez, Popineau, Mangavel, Larré, & Géguen, 1998; Irissin-Mangata et al., 2001; Vanin, Sobral, Menegalli, Carvalho, & Habitante, 2005). According to Jangchud & Chinnan (1999) and Vanin et al. (2005), glycerol is one of the best plasticizers that can be used in protein films, because it is water soluble, polar, non-volatile, protein miscible and has a low molecular weight and one hydroxyl group on each carbon.

The aim of this study was to evaluate the effect of the glycerol concentration on mechanical, water vapor barrier and thermal properties, and on water solubility and water sorption isotherms of films based on chicken feather keratin.

2. Materials and methods

White chicken feathers were supplied by a local industry. All chemicals were of analytical grade and were purchased from Nuclear, Diadema-Brazil, except for 2-mercaptoethanol, which was purchased from Vetec, Rio de Janeiro-Brazil. Spectra/Pordialysis membranes of regenerate cellulose (MWCO 6–8000 Da) were purchased from Spectrum Medical Industries (Laguna Hills, USA).

2.1. Pretreatment of the feathers

Freshly plucked wet feathers were cleaned according to ASTM (1997). Wet feathers were dried in a ventilated oven (Tecnal, Piracicaba-Brazil, model 398/2) at 40 °C for 72 h. The feathers were cut into small filaments (75–700 µm). Thirty-five grams of this material were treated in a Soxhlet device for 12 h with petroleum ether (boiling range 45–50 °C) to remove grease (Martelli, Moore, Gandolfo, Paes, Laurindo, 2006). The petroleum ether was evaporated and the dry feathers were stored at room temperature in closed containers.

2.2. Extraction of keratin

The extraction of feather keratin was performed according to the method proposed by Schrooyen et al. (2000) and Yamauchi et al. (1996), with some modifications (Martelli et al., 2006). Degreased feathers (~35 g) were immersed in 400 ml of aqueous solution containing 189 g urea, 30 g SDS and 46 ml 2-mercaptoethanol and 9.5 g *tris*(hydroxymethyl)-aminomethane (pH 9.0). This mixture was shaken at 50 °C under a nitrogen atmosphere in a jacketed reactor for 1 h and then filtered using paper filter. The filtrate was dialyzed in 35 L of distilled water using Spectra/Por dialysis membranes of regenerated cellulose (MWCO 6–8000 g/mol) for 72 h, changing the whole water

everyday. The protein concentration of the dialyzate was determined using a protein assay kit (GoldAnalisa, Belo Horizonte, Brazil), which is based on the Biuret method. Thus, the protein concentration was standardized at 7 g/100 ml by adding distilled water; then this dispersion was stored at 5 °C before use.

2.3. Amino acid composition of keratin

The amino acid composition of the extracted keratin was determined by ionic exchange chromatography with derivatization post-column with ninhidrin, using an HPLC DX300-Dionex (Sunnyvale, USA), after hydrolysis in 6 N hydrochloric acid at 110 °C for 24 h, according to Spackman, Stein and Moore (1958).

2.4. Preparation of feather keratin films

In total, 50 ml of the aqueous dispersion of the reduced keratins (7 g keratin/100 ml dispersion) were mixed with glycerol in the following concentrations: 0.01, 0.03, 0.05, 0.07 and 0.09 g/g of keratin. Higher glycerol concentrations made the films difficult to handle. All dispersions were prepared under constant magnetic stirring at room temperature and mixed for 1 h. These film forming dispersions were poured into polystyrene Petri dishes (15 cm diameter) and dried in a ventilated oven at 30 °C for 24 h (Martelli et al., 2006). After this, the films were removed from the casting surface (Petri dish) and stored for analyses. The thickness of the films was controlled by varying the volume of keratin dispersion poured into the Petri dish.

2.5. Film conditioning and film thickness

Prior to films properties determinations, all film specimens were conditioned at 35 °C and 75% relative humidity (RH) for at least 48 h. The thickness of the samples was measured (± 0.001 mm) using a Digimatic digital external micrometer (Mitutoyo Co., Japan) at four different points of the film. These values were used to calculate the average thickness.

2.6. Determination of dry matter density of keratin films

Film samples were maintained in a desiccator with phosphorus pentoxide at 0% RH for 20 days and weighed. Thus, dry matter densities were calculated by Eq. (1):

$$\rho^d = \frac{m}{A \times \delta} \quad (1)$$

where A is the film area (6 cm²), δ the film thickness (cm), m the film dry mass (g) and ρ^d the dry matter density of the film (g/cm³) (Larotonda, Matsui, Sobral, & Laurindo, 2005).

2.7. Solubility and swelling (SW) of keratin films in water

The film solubility (%) in water was defined as the ratio of water-soluble solids, after 24 h immersion in water, to the initial solid content. For that, three film samples with an area of $2 \times 3 \text{ cm}^2$ were cut, weighed and placed in an Erlenmeyers with 30 ml of distilled water, which were sealed with parafilm. During the assays, the Erlenmeyers were kept at 25°C in a thermostatic bath with mild stirring. These films, taken from Erlenmeyers, and original films were dried at 105°C for 48 h for determination of solid contents. The film solubility was the average value of three measurements (Turhan & Sahbaz, 2004).

The SW of films was determined according to the method proposed by Lee, Shim, and Lee (2004). Pre-dried sample strips ($2 \times 3 \text{ cm}^2$) were immersed in distilled water at 25°C for 6 h. After that, the superficial water was removed by contact with a filter paper (Whatman) for 1 min. The SW was determined as the weight gain of the swollen sample divided by the initial dry solid content. Each test consisted of three replicate measurements.

2.8. Water sorption isotherms

Samples of pre-dried films were weighed ($\pm 0.001 \text{ g}$) and conditioned at 20 and 35°C using saturated solutions to maintain constant water activity, in three replications, according to the classical gravimetric methodology (Larotonda et al., 2005). The saturated salt solutions (KOH, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{K}_2\text{CO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgNO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, NaNO_2 , NaCl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KCl and K_2SO_4) were chosen in order to vary the water activity between 0.06 and 0.97 (Rockland, 1960).

The Guggenheim–Anderson–de Boer (GAB) model (Eq. (2)) was used to fit keratin film sorption isotherm data:

$$X_e = \frac{X_m(Cka_w)}{(1 - ka_w)(1 - ka_w + Cka_w)} \quad (2)$$

where a_w is the water activity (RH/100), X_e the equilibrium moisture content on a dry weight basis, X_m the moisture content on a dry weight basis related to the water monomolecular layer, C the Guggenheim constant related to the first layer heat sorption and k the constant related to the total multilayer heat sorption.

2.9. Hydrophilicity of keratin films

The hydrophilicity (β) of keratin films expressed as [g water/g dry solid \times Pa] was calculated as proposed by Larotonda et al. (2005), using Eq. (3). The β parameter was calculated by the derivation of GAB equation (Eq. (2)) in relation to a_w and dividing the result by the vapor saturation pressure at the studied temperature (p_s). In this way, this parameter is a film property that indicates the water gain by 1 g of dry matter, when the partial pressure of water vapor in the surrounding air is increased by 1 Pa. It is possible to determine β from the GAB model

derivation, since the constants of the model are well-known, for a given temperature:

$$\beta = \frac{Ck W_m}{p_s} \times \left[\frac{1}{(1 - ka_w)(1 - ka_w + Cka_w)} - \frac{a_w}{[(1 - ka_w)(1 - ka_w + Cka_w)]^2} \times [-k(1 - ka_w + Cka_w) + (1 - ka_w)(-k + Ck)] \right] \quad (3)$$

2.10. Water vapor permeability (k_w)

The water vapor permeabilities (k_w) were determined gravimetrically using the methodology based on the ASTM standard method E96 (ASTM, 1980). Pre-conditioned films were firmly fixed onto the opening of cells containing a saturated saline solution and, then, these cells were placed in a glass chamber ($400 \times 400 \times 250 \text{ mm}^3$) containing another saturated saline solution (higher a_w). A small fan was installed inside the chamber to promote circulation of internal air and to maintain a homogeneous a_w in this space, at 35°C . The cells were weighed ($\pm 0.01 \text{ g}$) every 30 min for 12 h. The water activities differences used to determine the water vapor permeabilities of films were 0.02–0.33, 0.33–0.62 and 0.62–0.96. This procedure allows determining how k_w varies with a_w . The water vapor permeability (WVP) was calculated with Eq. (4) (Larotonda et al., 2005):

$$k_w = \frac{G}{t} \frac{\delta}{Ap_s(RH_1 - RH_2)} \quad (4)$$

where k_w is in (g/m sPa), δ is the average thickness of the keratin films (m), A the permeation area (0.005 m^2), RH_1 the chamber RH, RH_2 the RH inside the cells, and p_s the vapor saturation pressure in the oven (Pa); the term G/t (g water/s) was calculated by linear regression from the weight variation over time data, in steady state.

The barrier property k_w depends on the film hydrophilicity (β) and on the effective diffusion coefficient (D_{eff}), according to Eq. (5) (Larotonda et al., 2005):

$$k_w = \rho^s \beta D_{eff} \quad (5)$$

where ρ^s is the dry matter density of the film (g/cm^3).

2.11. Mechanical properties

The mechanical properties of the films were determined by the tensile tests, with a texturometer TA.XT2i (SMS, Surrey, UK), using ten replicates. For that, the films were cut in rectangles of 25 mm width and length 100 mm and fixed on the grips of the device with a gap of 70 mm. The films were tractioned at a speed of 0.3 mm/s. The E-modulus (E) was calculated from the linear part of the

stress–strain curve, between 0.0% and 1.0% elongation. Tensile strength and elongation at break were calculated as the stress at break and as the percentage of change of the original length of the specimen, respectively. These characterizations were run within 20 min after removing films from desiccators, to minimize adsorption/desorption of water by films.

2.12. Scanning electron microscopy (SEM)

Micrographs of the samples were obtained using a Philips XL-30 scanning electron microscope. The samples were coated with a fine gold layer before obtaining the micrographs. All samples were examined using an accelerating voltage of 10 kV.

2.13. Thermal analyses

Thermal properties of chicken feather keratin films were studied using a differential scanning calorimeter DSC 50-Shimadzu at a heating rate of 10 °C/min, between –50 and 200 °C, under argon atmosphere. The mass samples were about 3.0 mg, which were dried under vacuum before DSC analyses. The glass transition temperature (T_g) was calculated as the inflexion point of the base line, caused by the discontinuity of the specific heat of the sample (Sobral, Menegalli, Hubinger, & Roques, 2001).

3. Results and discussion

The keratin extracted in this work presented a high content of sulfured amino acids, namely cysteine and methionine (Table 1). These results agree with those found in the literature for wool keratin (Yamauchi et al., 1996)

Table 1
Amino acid composition (g amino acids/100 g of protein) of keratin used in this work

Amino acids	Concentration (%)
Aspartic acid	4.73
Glutamic acid	7.65
Serine	9.31
Glycine	6.18
Histidine	0.43
Arginine	5.36
Threonine	3.50
Alanine	3.56
Proline	8.77
Tyrosine	1.96
Valine	6.94
Methionine	1.30
Cysteine	7.63
Isoleucine	4.28
Leucine	7.04
Phenylalanine	4.20
Lysine	0.53

and for feather keratin from fowl (Arai, Takahashi, Yokote, Akahane, 1983). On the other hand, it can be observed that the polar amino acids, ionizable (4.7% aspartic acid, 7.7% glutamic acid and 5.4% arginine) or not ionizable (9.3% serine, 8.8 proline and 3.5% threonine), represent almost 40% of the total content of amino acids. Thus, the possibility of interactions between the glycerol and the protein matrix, such as hydrogen bonds, may be considered as high.

3.1. Scanning electron microscopy (SEM)

Figs. 1a and 1b are micrographs of chicken feather keratin films surfaces made without glycerol and with 0.01 g glycerol/g keratin, respectively, magnified 1000 times. A detail of 1b is presented in the Fig. 1d. It can be observed that the addition of glycerol produced a surface structure with more homogeneity than that produced without a plasticizer. But, in both cases, a very dense and coerced structure can be observed. Homogeneity and density can also be observed in the microscopic image of the internal microstructure obtained with a cryofractured sample (Fig. 1c) of films prepared with 0.09 g glycerol/g keratin. Some microcracks can be observed in this internal film structure, which can influence its mechanical properties.

3.2. Films solubility and swelling

Films solubility and swelling results are shown in Table 2. Water solubility increased from 30% for films without plasticizer to about 51% for films prepared with 0.09 g glycerol/g keratin. The relatively low solubility (30%) of keratin films without plasticizer allows to suggest that some –S–S– bridges were formed when drying films, although other interactions such as hydrogen bonds and electrostatic and hydrophobic interactions could also be improved, which contribute to explain the density of films microstructure (Fig. 1). The results also indicated that the addition of glycerol prevented the formation of these bridges, increasing the films solubility (Table 2). Solubility increase was more pronounced than could be expected only by extraction of added plasticizers. This means that the addition of glycerol allowed the increase in the solubilization of the matrix of keratin. The solubility values obtained in this work were relatively lower than those obtained with films based on cellulose (55–84%) or carrageen (41%) (Rhim, Park, Jung and Park, 1997), but higher than those obtained with fish myofibrillar proteins (12–20% for 30–70 g glycerol/100 g proteins, respectively) (Monterrey-Quintero & Sobral, 2000).

Swelling was 155% for films without glycerol, increasing to 207% for films with 0.07 g glycerol/g keratin. Yamauchi and Yamauchi (2002) reported swelling data of 140% for films of wool keratin plasticized with 50 g glycerol/100 g keratin.

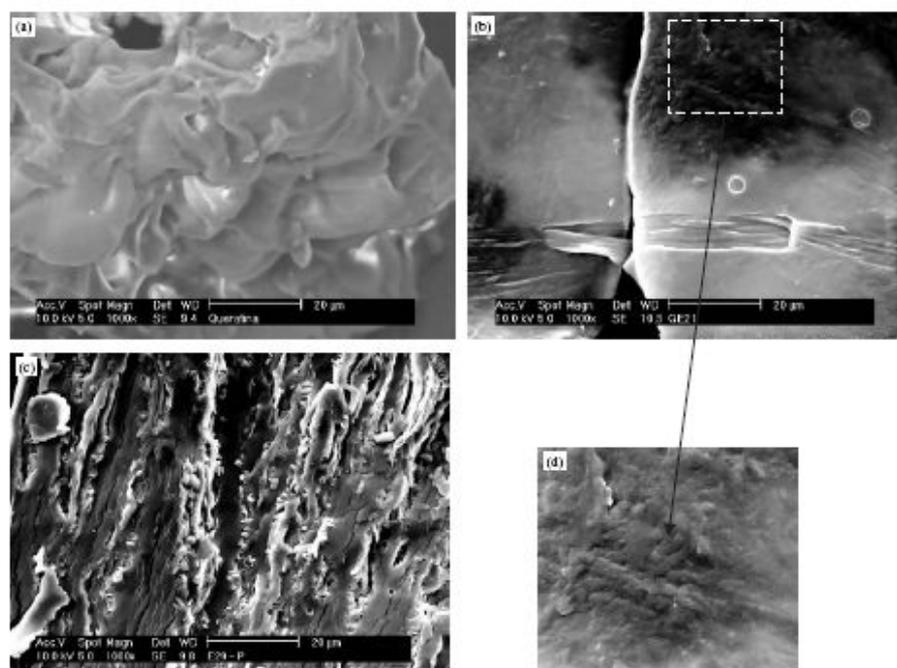


Fig. 1. Scanning electron microscopy of keratin films: (a) surface of a keratin film prepared without glycerol; (b) surface of a keratin film prepared with 0.01 g glycerol/g keratin; (c) cryofracture of a keratin film prepared with 0.09 g glycerol/g keratin; (d) detail of (b).

Table 2
Films solubility, films swelling index in water, glass transition temperature and mechanical properties of keratin films

Glycerol concentration (g glycerol/g keratin)	Film solubility in water (%)	Swelling index (%)	Glass transition temperatures of dry films (°C)	Mechanical properties		
				Tensile strength (MPa)	Elongation at break (%)	Young module (MPa/%)
0.00	30.7±1.5	155±7	70	16.6±5.5	1.7±0.2	10.2±7.1
0.01	—	—	—	6.3±0.7	11.9±2.6	2.0±0.8
0.03	37.0±1.3	182±2	67.5	7.6±0.6	13.8±2.4	2.1±0.6
0.05	40.6±3.8	191±35	64.5	5.3±0.7	19.8±4.1	1.2±0.2
0.07	48.3±2.7	207±15	56.3	5.4±0.5	30.5±7.7	0.9±0.6
0.09	50.7±1.0	110±13	—	2.0±0.2	31.9±4.5	0.2±0.0

3.3. Dry matter density

The dry matter density varied from 730 kg/m³ for films without glycerol to 920 and 1100 kg/m³ for films with 0.05 and 0.09 g glycerol/g keratin, respectively. These results agree with the previous explanation of the effect of plasticizer on the microstructure of films. In fact, the increasing in films density was due to the increase in the content of glycerol, which has a density of 1260 kg/m³, considering that neither the drying of films nor films preconditioning in desiccators with P₂O₅ by 20 days, at room temperature, provoked glycerol loss. This behavior

agrees with results obtained by Sánchez et al. (1998), who observed low volatility of glycerol when drying wheat gliadin films plasticized with different compounds (glycerol and five polyols of the ethylene glycol series). These authors explained this by the high boiling point (290 °C) of glycerol and by the interactions between glycerol and proteins.

3.4. Water sorption isotherms and film hydrophilicity (β)

Water sorption isotherms of chicken feather keratin films with different glycerol concentrations are showed in Fig. 2.

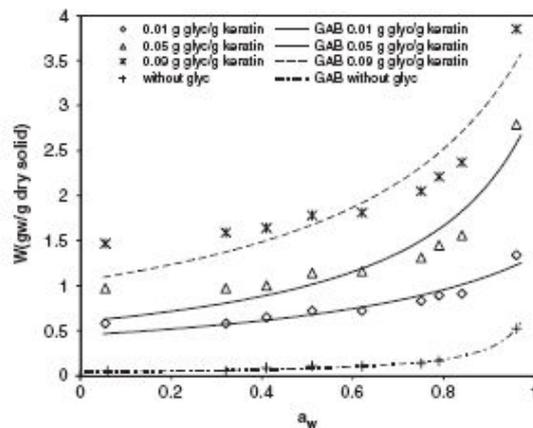


Fig. 2. Water sorption isotherms of keratin films prepared with different glycerol concentrations at 35 °C, fitted with the GAB model.

Table 3
Constants of GAB model fits, for sorption data, determined at 35 °C as a function of the glycerol concentration

Glycerol Concentration (g glycerol/g keratin)	GAB parameters			
	X_m	C	K	R^2
0.00	0.059	4.9×10^6	0.955	0.99
0.01	0.280	3.29×10^6	0.747	0.97
0.05	0.517	18.97×10^6	0.824	0.95
0.07	0.660	8.08×10^6	0.898	0.96

The GAB model was used to fit experimental data, showing a remarkable fit over a wide range of a_w values. Table 3 shows the GAB model constants, which were determined through non-linear regression. Sorption isotherms showed clearly that glycerol increased the films water sorption, as expected.

The β parameter behavior can show how strong this effect is (Larotonda et al., 2005; Martelli et al., 2006). The influence of glycerol concentration and water activity on β behavior is presented in Fig. 3.

3.5. Water vapor permeability (k_w)

The k_w values of film samples prepared with different glycerol concentrations obtained at 35 °C, with three different water activity gradients through the films (0.02–0.33, 0.33–0.62 and 0.62–0.96), are shown in Table 4. The addition of glycerol caused an increase in the k_w values of keratin films, as also was reported in the literature (Martelli et al., 2006; Sobral, Menegalli, Hubinger, & Roques, 2001).

On the other hand, it can be observed that the increase in the water activities used for k_w determinations provoked a

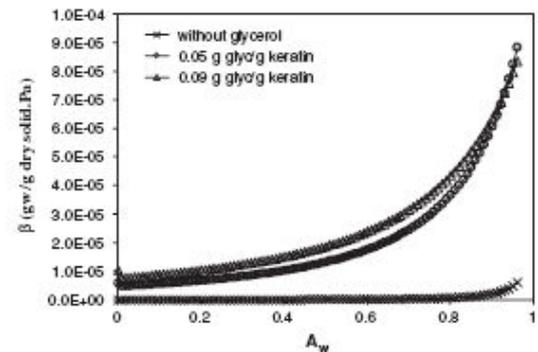


Fig. 3. Hydrophilicity values (β) for films prepared without glycerol and with 0.05 and 0.09 g glycerol/g keratin as a function of a_w .

considerable increase in the WVP for each glycerol concentration studied (Table 4). Classically, this behavior can be explained by the increase in the moisture content of films when higher water activities were used. The strong plasticizer effect of water molecules is well known (Rouilly, Orliac, Silvestre, & Rigal, 2001; Vanin et al., 2005). But, also, this behavior may be explained by means of Eq. (5), i.e., by the positive effects of glycerol on the film hydrophilicity and on the film density. These effects were more important than the negative effect of glycerol on the water diffusivity in the matrix of polymeric films (Table 4).

3.6. Mechanical properties

Films without plasticizers showed brittle characteristics and were difficult to handle, probably due to the aggregation of the protein chains mainly by –S–S– bridges (Table 2). This behavior agrees with the observed microstructure and density.

The addition of 0.01 g glycerol/g keratin decreased tensile strength by about 38% when compared with the value found for the films without glycerol, and the addition of 0.09 g glycerol/g keratin decreased this property by 8.3 times, which represents about 12% of the tensile strength for the non-plasticized keratin films. Similar results were observed with the Young modulus, which decreased from 10.18 to 0.21 MPa when 0.09 g glycerol/g keratin was added to the films. On the other hand, glycerol had a positive effect on the films elongation that increased by about 7 and 18.8 times for films prepared with 0.01 and 0.09 g glycerol/g keratin, respectively.

These behaviors agree with other studies on the effect of glycerol concentration on protein-based films: wheat gluten and soy proteins (Gennadios, Brandenburg, Park, Weller, & Testin, 1994), peanut proteins (Jangchud & Chinnan, 1999) and fish muscle proteins (Sobral, Santos, & Garcia, 2005) among others. Yamauchi and Yamauchi (2002) reported data on tensile strength of wool keratin-based films that can be considered as similar to those obtained in

Table 4
Water vapor permeability, hydrophilicity and diffusion coefficient of keratin films plasticized with 0.00, 0.05 and 0.09 g glycerol/g keratin

a_w gradient	Glycerol conc. (g glycerol/g keratin)	Films thicknesses (m)	k_w (g m/hm ² .Pa)	β (g w/g dry matter Pa)	D_{eff} (m ² /s)
0.02–0.33	No glycerol	1.26×10^{-4}	5.19×10^{-8}	6.47×10^{-8}	3.05×10^{-10}
0.33–0.62			1.79×10^{-7}	1.67×10^{-7}	4.08×10^{-10}
0.62–0.96			4.87×10^{-7}	3.18×10^{-6}	5.83×10^{-11}
0.02–0.33	0.05	1.26×10^{-4}	5.36×10^{-7}	6.85×10^{-6}	2.36×10^{-11}
0.33–0.62			1.34×10^{-6}	1.37×10^{-5}	2.95×10^{-11}
0.62–0.96			4.29×10^{-6}	5.35×10^{-5}	2.42×10^{-11}
0.02–0.33	0.09	1.15×10^{-4}	5.44×10^{-7}	1.05×10^{-5}	1.31×10^{-11}
0.33–0.62			1.36×10^{-6}	1.92×10^{-5}	1.79×10^{-11}
0.62–0.96			2.72×10^{-6}	5.43×10^{-5}	1.26×10^{-11}

this work. These authors found values ranging between 5 MPa (films conditioned at 85% RH) and 11 MPa (films conditioned at 65% RH), but for films plasticized with 0.5 g glycerol/g keratin.

3.7. Thermal properties

As expected, the glass transition temperatures (T_g) decreased with the increase in the glycerol concentration, as presented in Table 2. Normally, the glass transition temperature of protein-based films increases with chain stiffness and with an increase in inter- and intra-molecular attractive forces. As plasticizers decrease these interactions, they also decrease T_g values (Sobral et al., 2001, 2005).

The values of T_g obtained in this work imply that the dry films were in the glass state when conditioned at room temperature ($T < T_g$), but these films with a plasticizer constituted flexible materials. This behavior was also observed by other authors (Sobral et al., 2001, 2005), which explains the flexibility of films by the lubricating effect of plasticizers.

Also, the mechanical properties of films may be explained by their thermal properties, namely, the glass transition temperature. The relation between glass transition and tensile strength and Young's module may be observed in Fig. 4. The increase in T_g provoked an increase in the resistance and rigidity of films, as previously reported by Honary and Orafi (2002). Vanin et al. (2005) observed a linear increase in puncture forces when T_g values varied from 40 to 80°C, in gelatin-based films plasticized with glycerol.

4. Conclusions

Glycerol at different level concentrations decreased the maximum tensile strength of chicken feather keratin films and increased their elongation at break. In this way, the tensile strength and elongation at break can be controlled through the glycerol concentration added in the keratin dispersion used to obtain the samples. Low glycerol

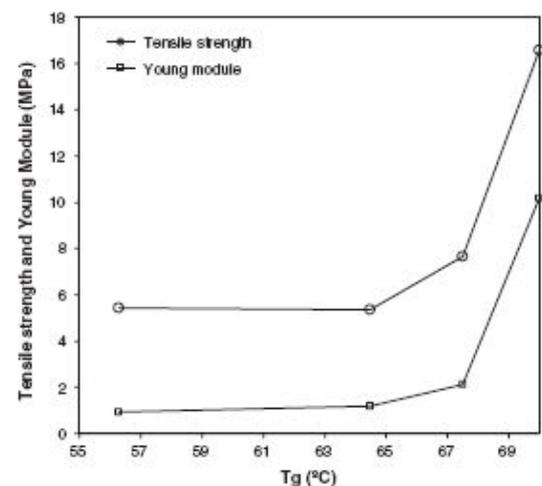


Fig. 4. Tensile strength and Young's module as a function of the glass transition temperature.

concentrations are enough to significantly modify these properties.

The microstructure of keratin films as modified by the addition of glycerol, which made the film surfaces more homogeneous, compared with films obtained without a plasticizer. The thermal analyses showed that an increase in glycerol concentration decreased glass transition temperature of films.

Keratin films showed low water solubility when compared with the values of other protein-based films present in the literature. It is a remarkable result, considering the possible application of these films to produce packings, for example.

Glycerol incorporation increased the hydrophilicity of chicken feather keratin films a lot. The use of this property was very useful to understand the phenomena controlling the water vapor barrier offered by the film. It was evidenced that the great increase in the material hydrophilicity

due to glycerol addition controlled the WVP of the films in all water activity ranges. This increase was always higher than the decrease of the water diffusion coefficient in the films. The proposed routine to decompose the mechanisms controlling the WVP of films can be useful to compare the action of various plasticizers in all kinds of films and contributes to a better understanding of this property behavior.

Acknowledgments

The authors thank the FINEP/CT-AGRO/FNDCT no. 0.1.02-0104.00 for their financial support that made this study possible. Work of project XI.20 of CYTED.

References

- Arai, K. M., Takahashi, R., Yokote, Y., & Akahane, K. (1983). Amino acid sequence of feather keratin from fowl. *European Journal Biochemistry*, *32*, 501–510.
- ASTM. (1980). Standard test methods for water vapor transmission of materials. In *Annual book of ASTM standards* (pp. 730–739). Designation E96-80, Philadelphia, USA.
- ASTM. (1997). Standard test methods for wool content of raw wool. In *Annual book of ASTM standards* (pp. 1–5). Designation (D584-96), Philadelphia.
- Gennadios, A., Brandenburg, A. H., Park, J. W., Weller, C. L., & Testin, R. F. (1994). Water vapor permeability of wheat gluten and soy protein isolate films. *Industrial Crops and Products*, *2*, 189–195.
- Honary, S., & Orfai, H. (2002). The effect of different plasticizer molecular weights and concentrations on mechanical and thermo-mechanical properties of free films. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, *28*, 711–715.
- Irisin-Mangata, J., Bouduin, G., Boutevin, B., & Gontard, . (2001). New plasticizers for wheat gluten films. *European Polymer Journal*, *37*, 1533–1541.
- Jangchud, A., & Chinman, M. S. (1999). Properties of peanut protein film: Sorption isotherm and plasticizer effect. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, *32*, 89–94.
- Larotonda, F. D. S., Matsui, K. N., Sobral, P. J. A., & Laurindo, J. B. (2005). Hygroscopicity and water vapor permeability os kraft paper impregnated with starch acetate. *Journal of Food Engineering*, *71*, 394–402.
- Lee, K. Y., Shim, J., & Lee, H. G. (2004). Mechanical properties of gellan and gelatin composite films. *Carbohydrate Polymers*, *56*, 251–254.
- Martelli, S. M., Moore, G. R. P., Gandolfo, C. A., Paes, S. S., & Laurindo, J. B. (2006). Influence of plasticizers on the water sorption isotherms and water vapor permeability of chicken feather keratin films. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie-Food Science and Technology*, *39*, 292–301.
- Monterrey-Quintero, E. S., & Sobral, P. J. A. (2000). Preparo e caracterização de proteínas miofibrilares de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) para elaboração de biofilmes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, *35*(1), 179–189.
- Rhim, J. H., Park, J. W., Jung, S. T., & Park, H. J. (1997). Formation and properties of corn zein coated k-carrageenan films. *Korean Journal of Food Science and Technology*, *29*, 1184–1190.
- Rockland, L. B. (1960). Saturated salt solutions for static control of relative humidity between 5°C and 40°C. *Analytical Chemistry*, *32*, 1375–1376.
- Rouilly, A., Orliac, O., Silvestre, F., & Rigal, L. (2001). Dsc Study on the thermal properties of sunflower proteins according to their water content. *Polymer*, *42*, 10111–10117.
- Sánchez, A. C., Popineau, Y., Mangavel, C., Larré, C., & Géguen, J. (1998). Effect of different plasticizers on the mechanical and surface properties of wheat gliadin films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*, 4539–4544.
- Spackman, D. H., Stein, W. H., & Moore, S. (1958). Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Analytical Chemistry*, *30*, 1190–1206.
- Sobral, P. J. A., Menegalli, F. C., Hubinguer, M. D., & Roques, M. A. (2001). Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. *Food Hydrocolloids*, *15*, 423–432.
- Sobral, P. J. A., Santos, J. S., & Garcia, F. T. (2005). Effect of protein and plasticizer concentrations in film forming solutions on physical properties of edible films based on muscle proteins of a Thai Tilapia. *Journal of Food Engineering*, *70*(1), 93–100.
- Schrooyen, P. M. M., Dijkstra, P. J., Oberthür, R., Bantjes, A., & Feijen, J. (2000). Partially carboxymethylated feather keratins. 1. Properties in aqueous systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*, 4326–4334.
- Schrooyen, P. M. M., Dijkstra, P. J., Oberthür, R., Bantjes, A., & Feijen, J. (2001a). Stabilization of solutions of feather keratins by sodium dodecyl sulfate. *Journal of Colloid and Interface Science*, *240*, 30–39.
- Schrooyen, P. M. M., Dijkstra, P. J., Oberthür, R., Bantjes, A., & Feijen, J. (2001b). Partially carboxymethylated feather keratins 2. Thermal and mechanical properties of films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*, 221–230.
- Turhan, K. N., & Sahbaz, F. (2004). Water vapor permeability, tensile properties and solubility of methylcellulose-based edible films. *Journal of Food Engineering*, *61*, 459–466.
- Vanin, F. M., Sobral, P. J. A., Menegalli, F. C., Carvalho, R. A., & Habitate, A. M. Q. B. (2005). Effects of plasticizers and their concentrations on thermal and functional properties of gelatin-based films. *Food Hydrocolloids*, *19*, 899–907.
- Yamauchi, K., Yamauchi, A., Kusunoki, T., Kohda, A., & Komishi, Y. (1996). Preparation of stable aqueous solution of keratins, and physicochemical and biodegradational properties of films. *Journal of Biomedical Materials Research*, *31*, 439–444.
- Yamauchi, A., & Yamauchi, K. (2002). Formation and properties of wool keratin films and coatings. In A. Gennadios (Ed.), *Protein based films and coatings* (pp. 253–274). Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
- Woodin, A. M. (1954). Molecular size, shape and aggregation of soluble feather keratin. *Biochemical Journal*, *57*, 99–109.

ANEXO II



Influence of plasticizers on the water sorption isotherms and water vapor permeability of chicken feather keratin films

Sílvia Maria Martelli, Geovana Moore, Sabrina Silva Paes,
Cristhiane Gandolfo, João Borges Laurindo*

Department of Chemical Engineering and Food Engineering, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, CEP 88040-900, Brazil

Received 26 July 2004; received in revised form 18 December 2004; accepted 20 December 2004

Abstract

Biodegradable films from many protein sources have in recent decades attracted a lot of attention for their potential use in food protection because they have several advantages over synthetic films, including those related to the environment. The effects of type and concentration of plasticizers on microstructure, sorption isotherms and water vapor permeability (WVP) of films obtained from chicken feather keratin (CFK) were investigated. Keratins were extracted with an aqueous solutions of urea, 2-mercaptoethanol and surfactant. The protein was dosed and the maximum concentration achieved was 12 g/100 ml. The protein concentration in the keratin film solution was standardized at 7 g/100 ml for the preparation of the films by casting. The results showed that increasing the plasticizer concentration caused a decrease in barrier properties and favored water adsorption by the polymeric network, increasing the moisture content of the films. The monolayer moisture content was 8.76 times higher for films made with glycerol than films made without plasticizer and 12 times higher than films plasticized with PEG 4000. The same behavior was observed for the water solubility coefficient, which increased with increasing plasticizer concentration.

© 2005 Swiss Society of Food Science and Technology. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Feather keratin; Plasticizers; Sorption isotherm; Water vapor permeability

1. Introduction

Population and economic growth worldwide has caused an enormous increase in waste production. To minimize this problem, alternatives are being studied, such as the recycling of plastic products and the substitution of conventional plastics for biodegradable ones. The growing demand for biodegradable polymers by emerging technologies including tissue engineering and regenerative medicine, gene therapy, novel drug delivery systems, implantable devices and nanotechnology has resulted in the development of a range of biodegradable polymers, mainly based on already

known chemistry (Heller, Domb, & Abraham, 2003). The main renewable sources of biopolymers are proteins, polysaccharides and lipids.

Keratin is the major structural fibrous protein contained in outer coverings such as hair, wool, feathers, nails and horns of mammals, reptiles and birds. From amino acid analysis, keratin has been found to be characteristically abundant in cysteine residues (7–20% of the total amino acid residues). These cysteine residues are oxidized to give inter- and intra-molecular disulfide bonds, which may result in the mechanically strong three-dimensionally linked network of keratin fiber. The flexible but tough property of wool and feathers may be attributed to this characteristic structure of keratin fiber (Woodin, 1954; Tanabe, Okitsu, Tachibana, & Yamachi, 2002). Also, although soluble feather keratins from various birds are relatively homogeneous with respect to

*Corresponding author. Tel.: +55 48 331 9930;
fax: +55 48 331 9687.

E-mail address: joao@enq.ufsc.br (J.B. Laurindo).

molecular weight (about 10 KDa), they are at the same time heterogeneous in composition (Arai, Takahashi, Yokote, & Akahane, 1983).

There is great interest in understanding the behavior of chicken feather keratin (CFK) films with plasticizers because few researches have focused on this field. Schrooyen, Dijkstra, Oberthür, Bantjes, and Feijen (2000) studied the effect of glycerol in CFK films formed by casting solutions. Studies on films formed by casting solutions of wool keratins and keratin–chitosan composite films with wool keratin have been carried out by some authors (Yamauchi, Yamauchi, Kusunoki, Kohda, & Konishi, 1996; Tanabe et al., 2002).

Protein film preparation involves the formation of a network in which interactions among polypeptide chains are modulated by a plasticizer (Park & Chinnan, 1995; Gennadios, Hanna, & Kurth, 1997; Weller, Gennadios, & Saraiva, 1998; Rhim, Gennadios, Weller, & Hanna, 2002). Plasticizers are added to coating formulations to increase elasticity of film formers. This helps to reduce coating brittleness and breakage, which is observed as flaking of coatings from the coated surface. Plasticizers are generally small molecules such as polyols like sorbitol, glycerol and polyethylene glycol (PEG) that intersperse and intercalate among and between polymer chains, disrupting hydrogen bonding and spreading the chains apart, which not only increases flexibility, but also water vapor and gas permeabilities (Baldwin & Baker, 2002).

Most biodegradable films, except lipid-based, are sensitive to moisture, and their properties change with changes in relative humidities. The water sorption isotherm of a material represents the equilibrium relationship between their moisture content and the water activity (a_w) at constant temperatures and pressures. The sorption isotherms obtained from experimental data result in an estimation of equilibrium moisture content, which is necessary to predict the properties of films in different environments pertinent to their application (Jangchud & Chinnan, 1999).

Information on the effects of sorbitol, glycerol and PEG on feather keratin films and their sorption isotherms is poorly available at present. Some authors have studied the sorption isotherms of keratins. Elshimi and Princen (1978) studied water-vapor sorption and desorption behavior of some keratins. Wortmann, Augustin, and Popescu (2001) have reported the temperature dependence of the water sorption isotherms of wool and these authors applied the D'Arcy/Watt model to sorption data of wool between 20 and 100 °C.

The aim of this investigation was to make a comparative study of different kinds of plasticizers and their concentrations applied to keratin films. This will determine the influence of the plasticizer on the film equilibrium moisture, microstructure, water coefficient solubility and water vapor permeability (WVP).

2. Materials and methods

White chicken feathers were supplied by a local industry. All chemicals were of analytical grade and were purchased from Nuclear-Brazil, except 2-mercaptoethanol, which was purchased from Vetec-Brazil. *Spectra/Pordialysis* membranes of regenerate cellulose (MWCO 6–8000 Da) were purchased from Spectrum Medical Industries (Laguna Hills, USA).

2.1. Pretreatment of the feathers

Freshly plucked wet feathers were cleaned with water at 60 °C and water at room temperature. Wet feathers were dried in a ventilated oven *Tecnal*, Brazil, (model 398/2) at 40 °C for 72 h. The feathers were cut into small filaments with 75–700 µm. Thirty-five grams of this material was treated in a Soxhlet device for 12 h with petroleum ether (boiling range 45–50 °C) to remove grease. The petroleum ether was evaporated and the dry feathers were stored at room temperature in closed containers.

2.2. Extraction of keratin

The extraction of feather keratin was performed according to the method proposed by Schrooyen et al. (2000) and Yamauchi et al. (1996) with some modifications. Degreased feathers (35 g) were immersed in 400 ml of aqueous solution containing 189 g urea, 30 g SDS and 46 ml 2-mercaptoethanol and 9.5 g tris(hydroxymethyl)aminomethane (pH 9.0). The mixture was shaken at 50 °C under a nitrogen atmosphere in a jacketed reactor for 1 h and then filtered using a commercial paper filter. The filtrate was dialysed in 35 l of distilled water using *Spectra/Por* dialysis membranes of regenerated cellulose (MWCO 6–8000 Da) for 72 h changing the outer water everyday. The protein concentration of the dialysate was 10 g/100 ml on average measured using a protein assay kit (GoldAnalisa), which is based on the Biuret method. The protein concentration of the dispersion was standardized at 7 g/100 ml and then, this dispersion with 7 g keratin/100 ml was stored at 5 °C before use.

2.3. Preparation of feather keratin films

Fifty milliliters of an aqueous dispersion of the reduced keratins (7 g keratin/100 ml dispersion) was mixed with the plasticizers in the following concentrations: 0.02, 0.05, 0.10, 0.20 and 0.30 g/g of keratin for sorbitol and PEG MW 4000 and 0.01, 0.03, 0.05, 0.07 and 0.09 g/g of keratin for glycerol. These plasticizer concentrations were chosen to compare with other studies in the literature on feather keratin films (Schrooyen, Dijkstra, Oberthür, Bantjes, & Feijen, 2001). For glycerol, lower concentrations were chosen

because with more than 0.10 g glycerol/g keratin the films were very difficult to dry and to handle. All dispersions were prepared under constant magnetic stirring at room temperature and mixed for 1 h. Each dispersion was poured into a polystyrene Petri dish (15 cm diameter) and dried in a ventilated oven at 30 °C for 24 h. After this time, the films were removed from the casting surface (Petri dish) and stored for the analyses. The thickness of the films was controlled through the volume of keratin dispersion poured into the Petri dish.

2.4. Film conditioning and film thickness

Prior to property testing, all film specimens were conditioned at 35 °C for at least 48 h at a 75% relative humidity (RH). The thickness of the samples was measured using a Digimatic digital external micrometer (Mitutoyo Co., Japan), with an exactness of ± 0.001 mm. Measurements of thickness were made at four different points on each film, and these were used to calculate the average values.

2.5. Scanning electron microscopy (SEM)

Micrographs of the samples were obtained using a Philips XL-30 scanning electron microscope (SEM). The samples were coated with a fine gold layer before obtaining the micrographs. All samples were examined using an accelerating voltage of 10 kV.

2.6. Water sorption isotherm

Saturated salt solutions were prepared from potassium hydroxide (KOH), magnesium chloride ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), potassium carbonate ($\text{K}_2\text{CO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), magnesium nitrate ($\text{MgNO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), sodium nitrite (NaNO_2), sodium chloride (NaCl), ammonium sulfate ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), potassium chloride (KCl) and potassium sulfate (K_2SO_4), to obtain 6, 32, 41, 51, 62, 75, 79, 84 and 97% RH, at 20 and 35 °C (Rockland, 1960).

First, the humidity of the films was determined. Film samples were then conditioned in desiccators having the desired RH (6, 32, 41, 51, 62, 75, 79, 84 and 97% RH) and the samples were weighed until three measurements of constant weight were obtained. This implied that the films were equilibrated at the desired RH. In each RH three samples of the same film were used. Four sorption isotherm equations (GAB (Guggenheim-Anderson-de Boer), BET (Brunauer-Emmett-Teller), Iglesias-Chirife and Smith) from the literature were used to fit keratin film sorption isotherm data (Gennadios, 2002). The isotherm models are expressed by Eqs. (1)–(4) and the coefficients were found using statistical modeling. The GAB moisture sorption model is widely used for films. It is an extension of the two-parameter BET model, taking

into account the modified properties of the sorbate in the multilayer region through the introduction of a third parameter, k .

GAB isotherm model:

$$X_e = \frac{W_m(Cka_w)}{(1 - ka_w)(1 - ka_w + Cka_w)}, \quad (1)$$

BET isotherm model:

$$X_e = \frac{W_m Ca_w}{(1 + Ca_w)} + \frac{W_m a_w}{1 - a_w}, \quad (2)$$

Iglesias-Chirife isotherm model:

$$X_e = B_1 \left[\frac{a_w}{(1 - a_w)} \right] + B_2, \quad (3)$$

Smith isotherm model:

$$X_e = A - B \ln(1 - a_w), \quad (4)$$

where a_w is the water activity (RH/100), X_e the equilibrium moisture content on a dry weight basis, W_m the moisture content on a dry weight basis related to the water monomolecular layer, C the Guggenheim constant related to the first layer heat sorption, k the constant related to the total multilayer heat sorption, and A , B , B_1 and B_2 the constants.

2.7. Water solubility coefficient of keratin films

The water solubility coefficients (β) of keratin films in [g water/g dry solid \times Pa] were calculated as proposed by Larotonda, Matsui, Sobral, and Laurindo (2005), Eq. (5).

$$\beta = \frac{Ck W_m}{p_s} \left[\frac{1}{(1 - ka_w)(1 - ka_w + Cka_w)} - \frac{a_w}{[(1 - ka_w)(1 - ka_w + Cka_w)]^2} \times [-k(1 - ka_w + Cka_w) + (1 - ka_w)(-k + Ck)] \right]. \quad (5)$$

The β parameter was calculated through the differential equation of the GAB model (Eq. (1)) in relation to a_w and dividing the result by p_s (where p_s is the vapor saturation pressure at the studied temperature). In this way, it was possible to determine β from the GAB model derivative, since the constants of the model are well-known, for a given temperature.

2.8. Water vapor permeability (WVP)

The WVP was determined according to ASTM E96-80 (1980). The films (0.005 m² disks) were fixed into the opening of cells containing calcium chloride. The calcium chloride was previously dried in a ventilated oven at 140 °C for 24 h. These cells were placed in a

hermetic chamber with sodium chloride, which was placed in a constant-temperature (35 °C) oven. In this way, the weight variation of each cell over time due to an RH gradient of 2–75% was determined. The cells were weighed every 30 min, with a semi-analytic scale for 12 h and a linear relationship between the quantity of water transferred per unit area and time was obtained. The WVP was calculated with Eq. (6) (Sarantópoulos

et al., 2002):

$$\text{WVP} = \frac{G}{t} \frac{e}{A p_s (\text{UR}_1 - \text{UR}_2)}, \quad (6)$$

where WVP is in g/m s Pa; e is the average thickness of the keratin films (mm); A is the permeation area (0.005 m²); UR_1 is the chamber RH; UR_2 is the RH inside the cells; p_s is the vapor saturation pressure in the

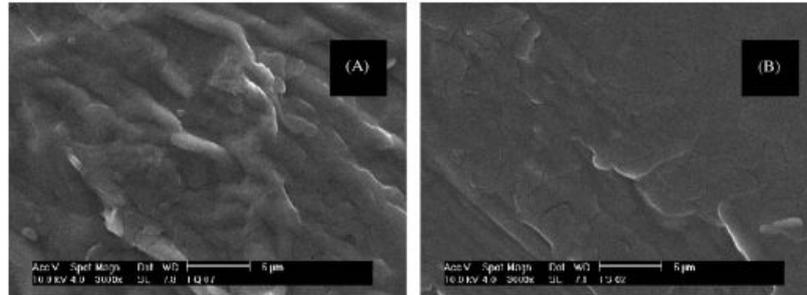


Fig. 1. SEM micrographs of CFK films without plasticizer (A) and with 0.02 g sorbitol/g keratin (B) with a magnification of 3000 × .

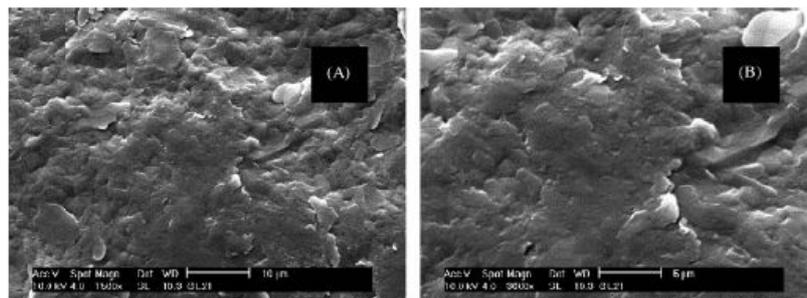


Fig. 2. SEM micrographs of CFK films with 0.01 g glycerol/g keratin with a magnification of 1500 × (A) and 3000 × (B).

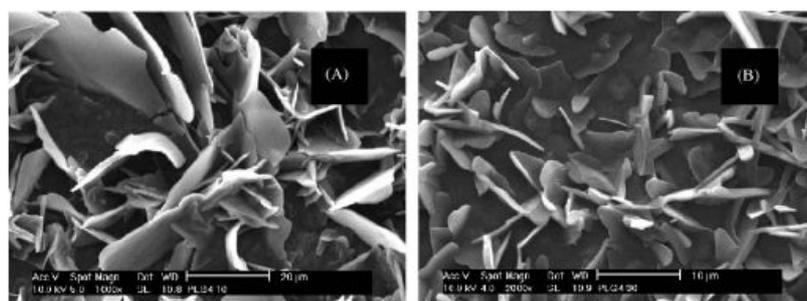


Fig. 3. SEM micrographs of CFK films with 0.10 g PEG 4000/g keratin with a magnification of 1000 × (A) and with 0.30 g PEG 4000/g keratin with a magnification of 2000 × (B).

oven (Pa); and the term G/t (g water/day) was calculated by linear regression from the weight variation over time data, in steady state.

WVP depends on the water solubility and on the effective diffusion coefficient, as obtained through Eq. (7):

$$WVP = \rho^s \beta D_{\text{eff}}, \quad (7)$$

where ρ^s is the dry matter density of the film (g/cm^3), D_{eff} is the effective diffusion coefficient. The diffusion coefficient describes the movement of permeating molecules through the polymer, and thus represents a kinetic property of the polymer–permeant system. Eq. (7) shows the importance of knowing the real influence of each parameter (β and D_{eff}) on the permeability of films.

3. Results and discussion

3.1. Scanning electron microscopy (SEM)

The SEM of keratin films carried out without and with different plasticizer concentrations can be seen in Figs. 1–3. Fig. 1A shows the SEM of a keratin film without plasticizer while in Fig. 1B we can see the SEM of keratin films with 0.02 g sorbitol/g keratin. The magnifications were $3000\times$. Figs. 2A and B show the micrographs of CFK films with 0.01 g glycerol/g keratin with magnifications of $1500\times$ and $3000\times$, respectively. Fig. 3A shows the micrograph of CFK films with 0.10 g PEG/g keratin with a magnification of $1000\times$ and Fig. 3B shows films with 0.30 g PEG/g keratin with a magnification of $2000\times$. It can be seen from Figs. 1–3 that the plasticizers have a great influence on the microstructure of feather keratin films. With the use of sorbitol, the film surfaces showed a more uniform aspect.

The films made with glycerol and sorbitol appear to be more flexible compared with the CFK film made with PEG 4000. This is probably because glycerol and sorbitol have low molecular weights. Besides the integrity of CFK films made with 0.30 g PEG being affected, they had a lower stiffness and were more difficult to handle compared with films made with glycerol and sorbitol.

3.2. Moisture sorption isotherms

Moisture sorption isotherms of CFK films at 20 and 35°C within the 6–97% RH range are presented in Figs. 4–6. Estimated parameters and quality of fit for the four fitted moisture sorption models are shown in Table 1 for CFK films with 0.05 g plasticizer/g keratin. It can be seen from Table 1 that the GAB model gives the best fit for all curves. Thus, only the GAB model was

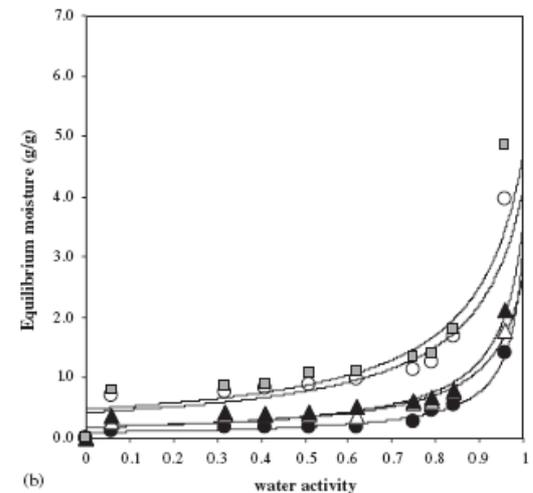
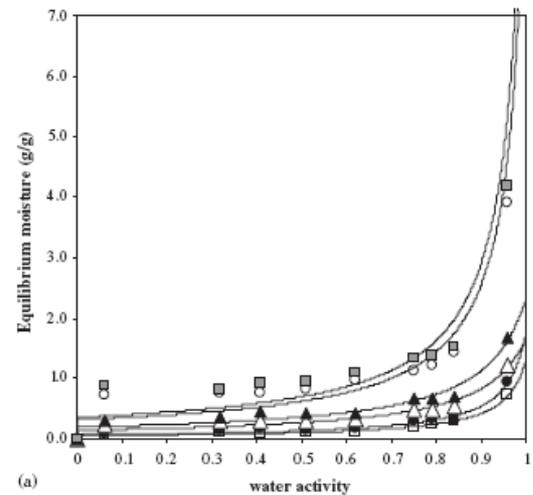


Fig. 4. Effect of sorbitol concentration (0.00 (\square), 0.02 (\bullet), 0.05 (Δ), 0.10 (\blacktriangle), 0.20 (\circ) and 0.30 (\blacksquare) g sorbitol/g keratin) on the equilibrium moisture content of CFK films at two temperatures 20°C (a) and 35°C (b), fitted with the GAB model.

used to fit other curves. The GAB model showed a remarkable fit over a wide range of a_w values and a better evaluation of content of water tightly bound by the primary adsorption sites (Roy, Gennadios, Weller, & Testin, 2000). All the curves have the characteristic sigmoidal shape of sorption isotherms obtained for soluble products and show an asymptotic trend as water activity tends toward 1.

Results from Table 2 suggest that the monolayer moisture content increased around fivefold when the

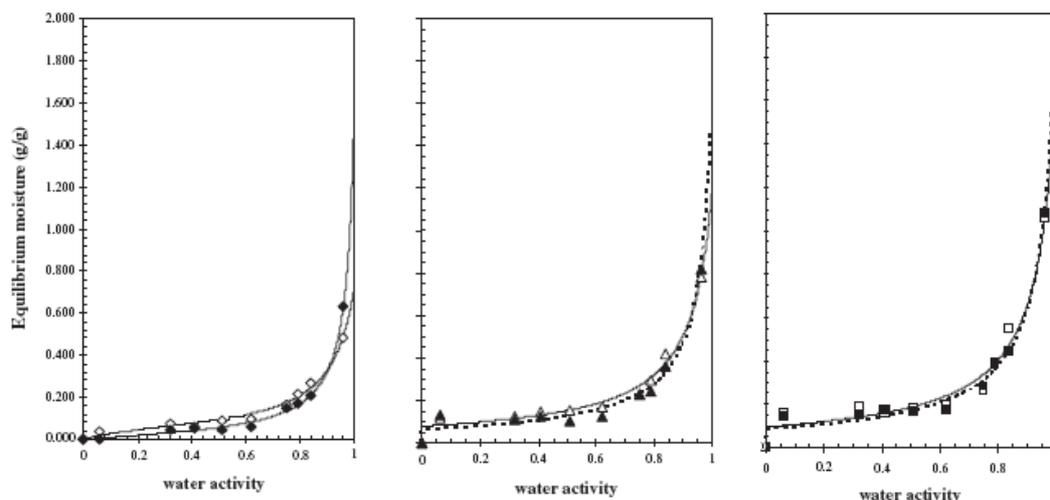


Fig. 5. Effect of temperature at 20 °C empty symbol and 35 °C to full symbol on the sorption isotherms of CFK films with 0.02 (\diamond , \blacklozenge), 0.10 (\triangle , \blacktriangle) and 0.30 (\square , \blacksquare) PEG 4000/g keratin fitted with GAB model.

sorbitol concentration ranged from 0.02 to 0.30 g/g keratin. For PEG 4000, this value increased by a factor of around 1.7 when its concentration ranged from 0.02 to 0.30 g/g keratin. In the case of glycerol, increasing the plasticizer concentration from 0.01 to 0.07 g/g keratin, the W_m value increased by a factor of around 2.33.

For curves fitted with the GAB model at 35 °C (Table 2), the highest moisture contents related to the water monomolecular layer were obtained for films plasticized with glycerol (0.05 g/g keratin), which gave a value for W_m 8.76 times higher than films without plasticizer, 12 times higher than films plasticized with PEG 4000 at the same concentration and 3.42 times higher than films with sorbitol. These results indicate that PEG 4000 decreased the monolayer moisture content.

Fig. 4 shows the effect of sorbitol concentration on moisture content of CFK films. It can be seen from Fig. 4 that increasing the sorbitol concentration causes an increase in the equilibrium moisture content. An increase in PEG concentration also causes an increase in the equilibrium moisture content. This behavior is to be expected, since films with a higher concentration of plasticizer absorb more moisture at a given a_w , because plasticizer molecules provide more active sites to bind water molecule hydroxyl groups. The equilibrium moisture contents of CFK films with glycerol were higher than the others, which is probably related to how easily it is incorporated into the keratin chain and associates with the hydrophilic amino acids like serine residues and tyrosine residues.

The effect of temperature (20 and 35 °C) on the moisture content of CFK films plasticized with PEG MW 4000 at three concentration levels (0.02, 0.10 and 0.30 g/g keratin) can be seen in Fig. 5. The effect obtained was as expected, since an increase in the temperature causes a decrease in the equilibrium moisture content, for almost all materials.

Moisture sorption isotherms for CFK films as a function of temperature (Fig. 5) and plasticizer concentration (Fig. 4) showed a behavior typical of hydrophilic materials. Equilibrium moisture content decreased with temperature and increased with the amount of plasticizer.

Fig. 6 shows the effect of glycerol concentration on the moisture content of the films at two temperatures 20 and 35 °C. Calculated constants for all the models are shown in Table 1 for films at 35 °C and with 0.05 g plasticizer/g keratin and the calculated GAB model constants are shown in Tables 2 and 3 for films at 35 and 20 °C, respectively, for different plasticizer concentrations.

The GAB model was found to fit moisture sorption data extremely well for all films. The sigmoid-shaped curves are typical of high protein content material and indicate that water is adsorbed in multimolecular layers according to the Brunauer–Emmet–Teller theory (Cug, Gontard, & Guilbert, 1999).

It can be seen that the monolayer moisture content of CFK films increases with an increase in plasticizer concentration and is dependent on the type of plasticizer. Glycerol gave the highest monolayer moisture content. Also, a temperature influence can be noted

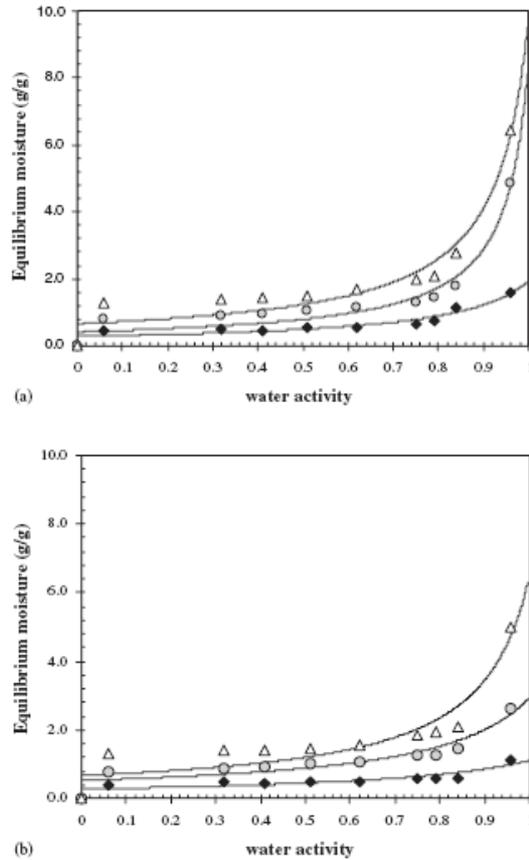


Fig. 6. Effect of glycerol concentration at level concentrations of 0.01 (\blacklozenge), 0.05 (\circ) and 0.07 (Δ) g/g keratin on the equilibrium moisture content of the films at two temperatures 20 °C (a) and 30 °C (b), fitted with GAB model.

mainly for the monolayer moisture content, which decreases at higher temperatures.

The monolayer value indicates the amount of moisture that was adsorbed in a single layer by binding sites in the film. The addition of plasticizer provides more active sites where moisture molecules can be adsorbed, with hydrophilic hydroxyl groups being present at the film surface (Cho & Rhee, 2002).

The monolayer moisture content of myofibrillar protein-based films may be associated with the number of hydrogen-binding amino acids that could interact with water in myofibrillar proteins (Cuq et al., 1999). The k parameter of the GAB model was found to be independent of composition. In all cases studied, the CFK films showed lower monolayer moisture contents than those of the peanut protein films studied by Jangchud et al. (1999), which had monolayer moisture contents in the range of 21.42–24.51 on a dry weight basis.

3.3. Water solubility coefficient

The behavior of the water solubility coefficient (β) of keratin/plasticizer films in relation to water activity is presented in Fig. 7. The solubility of keratin films without plasticizer is presented in Fig. 7a, together with results obtained for the CFK plasticized with PEG 4000. For $a_w = 0.9$ films without plasticizer the β value was 3.3×10^{-5} [g water/g dry solid \times Pa], while film plasticized with 0.02 g PEG 4000/g keratin presented a β value close to 2×10^{-5} [g water/g dry solid \times Pa], suggesting a reduction in the keratin film solubility. The β value increased only for PEG concentrations greater than 0.10 g PEG/g keratin. The solubility of keratin films plasticized with sorbitol and glycerol are presented in Figs. 7b and c, respectively. The β values increased with

Table 1

Constant values and correlation coefficients (R^2) for sorption curve equations for CFK films with 0.05 g plasticizer/g keratin at 35 °C

Model	Constant and R^2	Without plasticizer	Glycerol	Sorbitol	PEG 4000
GAB	W_m	0.059	0.517	0.151	0.043
	C	5,923,930	18,968,700	3,856,226	2,988,024
	K	0.954	0.824	0.910	0.973
	R^2	0.994	0.932	0.963	0.996
BET	W_m	0.032	0.131	0.043	0.027
	C	1,744,251	2,452,646	1,120,329	1,964,973
	R^2	0.876	—	0.874	0.970
Iglesias-Chirife	B_1	0.027	0.082	0.036	0.026
	B_2	0.092	0.797	0.130	0.042
	R^2	0.949	0.797	0.959	0.973
Smith	A	-0.011	0.442	-0.005	-0.050
	B	0.199	0.639	0.263	0.183
	R^2	0.922	0.888	0.912	0.890

Table 2
Constant values and correlation coefficient (R^2) for sorption curve equations for CFK films fitted with the GAB model at 20 °C

Plasticizer	Plasticizer concentration (g/g keratin)	20 °C			
		W_m	C	k	R^2
Without plasticizer	—	—	—	—	—
Sorbitol	0.02	0.098	1,355,715	0.970	0.988
	0.05	0.182	12,391,200	0.933	0.973
	0.10	0.189	1,965,224	0.948	0.967
	0.20	0.429	15,534,200	0.896	0.968
	0.30	0.482	3,334,891	0.898	0.965
Polyethylene glycol (4000)	0.02	0.058	740,524	0.921	0.989
	0.10	0.082	2,049,343	0.933	0.987
	0.30	0.099	2,859,672	0.944	0.976
Glycerol	0.01	0.283	1,741,554	0.853	0.944
	0.05	0.412	14,417,200	0.952	0.964
	0.07	0.659	5,551,889	0.933	0.979

Table 3
Constant values and correlation coefficients (R^2) for sorption curve equations for CFK films fitted with the GAB model at 35 °C

Plasticizer	Plasticizer concentration (g/g keratin)	35 °C			
		W_m	C	k	R^2
Without plasticizer	—	0.060	4,923,930	0.955	0.994
Sorbitol	0.02	0.076	923,087	0.958	0.978
	0.10	0.200	5,587,832	0.915	0.961
	0.20	0.324	2,976,854	0.970	0.967
	0.30	0.364	5,249,142	0.972	0.962
Polyethylene glycol (4000)	0.02	0.042	2,273,462	0.974	0.995
	0.10	0.066	3,067,441	0.958	0.984
	0.30	0.088	6,351,291	0.957	0.991
Glycerol	0.01	0.280	3,287,825	0.747	0.889
	0.05	0.517	18,968,700	0.824	0.932
	0.07	0.660	8,082,874	0.898	0.904

plasticizer concentration in both cases, but films with glycerol had greater β values, for the same plasticizer concentration. In this way, the films with 0.07 g glycerol/g keratin had the highest β value, i.e., 3.4×10^{-4} g water/g dry solid \times Pa for $a_w = 0.9$. These data will be useful in identifying the relative influence of β on the WVP of keratin films.

3.4. Water vapor permeability

WVP was evaluated at 35 °C and with a 2–75% RH gradient through the films. For comparison, the WVP of

some protein films with different glycerol concentrations can be seen in Table 4. As expected, the use of glycerol causes the film to have higher water vapor permeabilities.

Glycerol is a low molecular weight plasticizer (92 g/mol), so it easily penetrates the keratin film structure and since it has a hydroxyl group on each carbon this renders the films very hydrophilic, favoring more water absorbing into the polymer and increasing the WVP through the specimens.

Another explanation is that with the addition of glycerol, the network may become less dense because of an increase in the mobility of the polymeric chains and in the free volume between the chains, causing the protein network to relax. Table 4 shows also that increasing the plasticizer concentration caused an increase in the keratin film thickness. This was to be expected since glycerol expands the polymer network increasing the free volume inter- and intra-molecular chains of keratin films. The consequences of the plasticizing action of glycerol are favorable to the adsorption and absorption of water molecules to the film, so the WVP is substantially increased (Irissin-Mangata, Bauduin, Boutevin, & Gontard, 2001).

For comparison, WVP values of some protein films plasticized with glycerol are also presented in Table 4. Feather keratin films plasticized with glycerol presented WVP values in the same range as edible methylcellulose films and lower than peanut proteins films, meat myofibrillar proteins and fish water-soluble proteins. Another point is that CFK films without plasticizer gave the lowest WVP values of all the specimens.

4. Conclusions

Keratin films with different plasticizers presented different microstructures that had implications on the film properties. Films made with PEG 4000, which has long chains, were more brittle than films made with sorbitol, which were the most homogeneous.

This work demonstrated that plasticizers increased the equilibrium moisture content and therefore the water solubility of keratin films. Regarding the kind of plasticizer, glycerol showed the strongest effect on film moisture content and solubility, because of its high hydrophilicity. Sorption isotherms of keratin films at 20 and 35 °C did not vary greatly and only indicated a slight effect on the monolayer moisture content. The GAB model was found to be the best model to fit experimental data of keratin films.

In relation to the WVP, an increase in the glycerol concentration increased this property, mainly due to the water solubility increase, which increased with glycerol concentration. Appropriate selection of plasticizer type

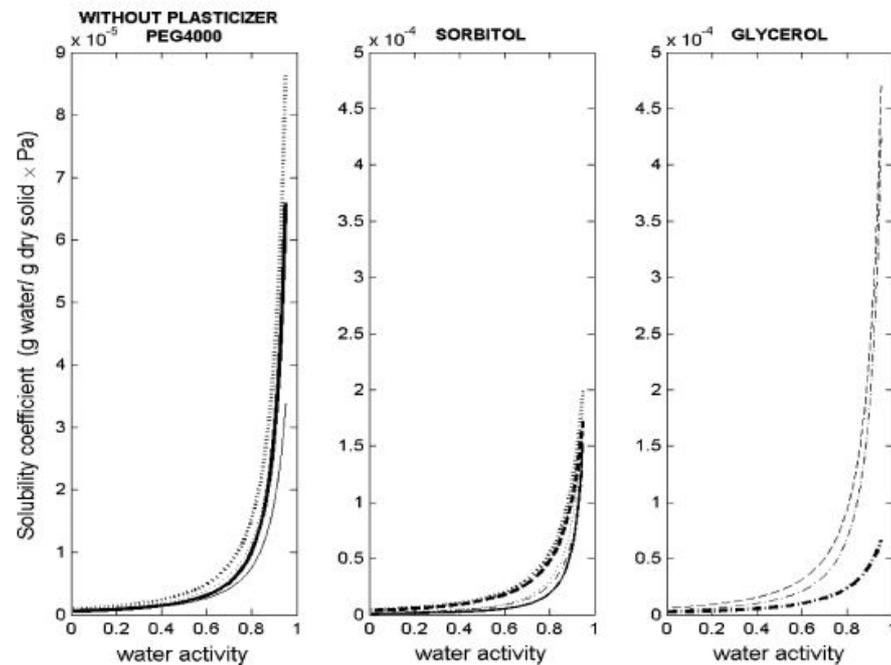


Fig. 7. Water solubility coefficient for films without plasticizer and with plasticizers at 35 °C. Without plasticizer and with PEG 4000 (— Without plasticizer; - - - 0.02; 0.10; 0.30 g/g keratin); sorbitol (— 0.02; - - - 0.05; 0.10; - - - 0.20; 0.30 g/g keratin) and glycerol (..... 0.01; - - - 0.05; - - - 0.07 g/g keratin).

Table 4
Water vapor permeability of protein films

Glycerol concentration (g/g keratin)	Thickness (mm)	WVP ^a (g/ms Pa) × 10 ¹⁰	Reference
0.00	0.132 ± 0.020	0.096 ± 0.062	This work
0.01	0.094 ± 0.013	0.117 ± 0.000	
0.03	0.106 ± 0.006	0.390 ± 0.008	
0.05	0.106 ± 0.014	0.622 ± 0.016	
0.07	0.134 ± 0.014	0.820 ± 0.081	
0.09	0.138 ± 0.012	1.066 ± 0.070	
Films	Gradient (%)		
FWSP (0.40 g glycerol/protein)	0–100	0.950	Tanaka, Iwata, Sanguandeeikul, Handa, and Ishizaki (2001)
FWSP (0.50 g glycerol/protein)	0–100	1.195	
FWSP (0.70 g glycerol/protein)	0–100	1.164	
Peanut protein films (0.67 g glycerol/protein)	0–50	1.045 ± 0.152	Jangchud and Chinnan (1999)
Peanut protein films (1.17 g glycerol/protein)	0–50	1.231 ± 0.240	
Peanut protein films (1.67 g glycerol/protein)	0–50	1.038 ± 0.476	Turhan and Sahbaz (2004)
MC 1.5 g MC/100 ml solvent)	0–52	0.598 ± 0.369	
MC 3.0 g MC/100 ml solvent)	0–52	0.514 ± 0.073	
MC 4.0 g MC/100 ml solvent)	0–52	0.494 ± 0.152	
MC 5.0 g MC/100 ml solvent)	0–52	0.523 ± 0.089	
MC 6.0 g MC/100 ml solvent)	0–52	0.525 ± 0.361	
PMCB (0.30 g glycerol/protein)	—	1.060	Sobral (2000)
PMCB (0.40 g glycerol/protein)	—	1.111	
PMCB (0.60 g glycerol/protein)	—	2.831	

FWSP: fish water-soluble proteins; MC: edible methylcellulose films; PMCB: meat myofibrillar proteins.

^aAverage and standard deviation values of three experiments are reported.

and concentration can be helpful in controlling moisture content and WVP of CFK films.

Thus, this paper provides new information about hydrophilicity, microstructure and WVP of keratin films, which is not currently available in the literature.

Acknowledgements

The authors thank the FINEP-PERDIGÃO-Brazil for their financial support, which made this study possible.

References

- Arai, K. M., Takahashi, R., Yokote, Y., & Akahane, K. (1983). Amino-acid sequence of feather keratin from fowl. *European Journal of Biochemistry*, *132*, 501–510.
- ASTM. (1980). Standard test methods for water vapor transmission of materials. In *Annual book of ASTM standards* (pp. 771–778). Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials.
- Baldwin, E. A., & Baker, R. A. (2002). Use of proteins in edible coatings for whole and minimally processed fruits and vegetables. In *Protein-based films and coatings* (pp. 501–513). Florida, USA: CRC Press.
- Cho, S. Y., & Rhee, C. (2002). Sorption characteristics of soy protein films and their relation to mechanical properties. *Lebensmittel—Wissenschaft und—Technologie*, *35*, 151–157.
- Cuq, B., Gontard, N., & Guilbert, S. (1999). Effects of thermomoulding process condition on the properties of agro-materials based on fish myofibrillar proteins. *Lebensmittel—Wissenschaft und—Technologie*, *32*, 107–113.
- Elshimi, A. F., & Princen, H. M. (1978). Water-vapor sorption and desorption behavior of some keratins. *Colloid and Polymer Science*, *256*(2), 105–114.
- Gennadios, A. (2002). *Protein-based films and coatings*. Boca Raton, FL: CRC Press (pp. 329–337).
- Gennadios, A., Hanna, M. A., & Kurth, L. B. (1997). Application of edible coatings on meats, poultry and seafoods: a review. *Lebensmittel—Wissenschaft und—Technologie*, *30*, 337–350.
- Heller, J., Domb, & Abraham, J. (2003). Recent developments with biodegradable polymers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *55*, 445–446.
- Irissin-Mangata, J., Bauduin, G., Boutevin, B., & Gontard, N. (2001). New plasticizers for wheat gluten films. *European Polymer Journal*, *37*, 1533–1541.
- Jangchud, A., & Chinnan, M. S. (1999). Properties of peanut protein film: sorption isotherm and plasticizer effect. *Lebensmittel—Wissenschaft und—Technologie*, *32*, 89–94.
- Larotonda, F. D. S., Matsui, K. N., Sobral, P. J. A., & Laurindo, J. B. (2005). Hygroscopicity and water vapor permeability of kraft paper impregnated with starch acetate. *Journal of Food Engineering* (in press).
- Park, H. J., & Chinnan, M. S. (1995). Gas and water vapor barrier properties of edible films from protein and cellulosic materials. *Journal of Food Engineering*, *25*, 497–507.
- Rhim, J. W., Gennadios, A., Weller, C. L., & Hanna, M. A. (2002). Sodium dodecyl sulfate treatment improves properties of cast films from soy protein isolate. *Industrial Crops and Products*, *15*, 99–205.
- Rockland, L. B. (1960). Saturated salt solutions for static control of relative humidity between 5°C and 40°C. *Analytical Chemistry*, *32*(10), 1375–1376.
- Roy, S., Gennadios, A., Weller, C. L., & Testin, R. F. (2000). Water vapor transport parameters of a cast wheat gluten film. *Industrial Crops and Products*, *22*, 43–50.
- Sarantópoulos, C. I. G. L., Oliveira, L. M., Padula, M., Coltro, L., Alves, R. M. V., & Garcia, E. E. C. (2002). Taxa de permeabilidade ao vapor d'água de filmes e embalagens flexíveis por método gravimétrico. In *Embalagens plásticas flexíveis: principais polímeros e avaliação de propriedades* (pp. 189–195). Campinas, Brasil: CETEA/ITAL.
- Schrooyen, P. M. M., Dijkstra, P. J., Oberthür, R., Bantjes, A., & Feijen, J. (2000). Partially carboxymethylated feather keratins. 1. Properties in aqueous systems. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, *48*, 4326–4334.
- Schrooyen, P. M. M., Dijkstra, P. J., Oberthür, R., Bantjes, A., & Feijen, J. (2001). Partially carboxymethylated feather keratins. 2. Thermal and mechanical properties of films. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, *49*, 221–230.
- Sobral, P. J. A. (2000). *Proteínas de origem animal na tecnologia de biofilmes* (p. 158). Tese de livre-docência. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Tanabe, T., Okitsu, N., Tachibana, A., & Yamauchi, K. (2002). Preparation and characterization of keratin-chitosan composite film. *Biomaterials*, *23*, 817–825.
- Tanaka, M., Iwata, K., Sanguandeeikul, R., Handa, A., & Ishizaki, S. (2001). Influence of plasticizers on the properties of edible films prepared from fish water-soluble proteins. *Fisheries Science*, *67*, 346–351.
- Turhan, K. N., & Sahbaz, F. (2004). Water vapor permeability, tensile properties and solubility of methylcellulose-based edible films. *Journal of Food Engineering*, *61*, 459–466.
- Yamauchi, K., Yamauchi, A., Kusunoki, T., Kohda, A., & Konishi, Y. (1996). Preparation of stable aqueous solution of keratins, and physicochemical and biodegradational properties of films. *Journal of Biomedical Materials Research*, *31*, 439–444.
- Weller, C. L., Gennadios, A., & Saraiva, R. (1998). Edible bilayer films from zein and grain sorghum wax or carnauba wax. *Lebensmittel—Wissenschaft und—Technologie*, *31*, 279–285.
- Woodin, A. M. (1954). Molecular size, shape and aggregation of soluble feather keratin. *Biochemical Journal*, *57*, 99–109.
- Wortmann, F. J., Augustin, P., & Popescu, C. (2001). Temperature dependence of the water-sorption isotherms of wool. *Journal of Applied Polymer Science*, *79*(6), 1054–1061.

ANEXO III

QUERATINA DE PENAS DE FRANGO: EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E OBTENÇÃO DE FILMES¹

Geovana R.P. MOORE², Silvia M. MARTELLI², Cristhiane A. GANDOLFO²,
Alfredo T.N. PIRES³, João B. LAURINDO^{2,*}

RESUMO

Apresenta-se neste trabalho um processo brando de extração de queratina de penas de frango em solução aquosa contendo uréia, 2-mercaptoetanol e um surfactante (pH 9,0). Foram realizadas as determinações das massas molares, do perfil de aminoácidos e da estabilidade térmica da queratina extraída. Resultados preliminares relativos às propriedades mecânicas de filmes de queratina obtidos por *casting* também são apresentados. A extração proporcionou um rendimento de 94% em relação à queratina presente inicialmente nas penas secas. As massas molares dos compostos presentes na solução de queratina extraída foram determinadas por eletroforese e variaram entre 10 e 14.000 g mol⁻¹. A termogravimetria da queratina extraída mostrou que o processo de extração não modificou a temperatura de degradação da queratina. Os filmes de queratina obtidos apresentaram propriedades que estão de acordo com dados da literatura.

Palavras-chave: penas, queratina, 2-mercaptoetanol, massas molares, aminoácidos, filmes.

SUMMARY

CHICKEN FEATHER KERATIN: EXTRACTION, CHARACTERIZATION AND FILMS PREPARATION. The objective of this study was to extract and to determine the average molecular weight, the amino acids profile, and the thermal stability of feather keratin and the basic properties of the obtained films. The extraction, carried out with an aqueous solution containing urea, 2-mercaptoethanol and surfactant (pH 9.0), allowed the extraction of 94% of the keratin presented in the dry feather. The keratin molecular weights were determined by electrophoresis and ranged from 10 to 14,000 g mol⁻¹. Thermogravimetric analyses of keratin showed that the extraction process did not change the degradation temperatures of keratin. The films of feather keratin presented lower tensile strength and about the same elongation at break than films of wool keratin cited by the literature.

Keywords: feather, keratin, 2-mercaptoethanol, molar mass, amino acids, films.

1 - INTRODUÇÃO

Nos vertebrados, as principais epidermes tais como cabelos, penas, cascos, escamas, bicos e unhas são resultados de um processo de diferenciação de células epiteliais especializadas, denominadas de queratinócitos. Durante este processo, o tecido epitelial é convertido em um material inerte, fibroso, resistente e insolúvel em água, com pequenas diferenças entre as várias espécies e que gera um ótimo revestimento de proteção externa [6, 7, 20].

Queratinas são polipeptídios formados por unidades de aminoácidos, com massa molar média da ordem de 10.000 g mol⁻¹, apresentando resíduos de cisteína na proporção de 7 a 20% do número total de resíduos de aminoácidos [14, 22]. Pertencem à classe de proteínas fibrosas, com formação de pontes dissulfeto inter ou intramolecular, resultando em um material com características de conformação rígida e tenaz, devido à rede tridimensional das fibras de queratina [16,17]. Essas proteínas apresentam as cadeias de polipeptídios fortemente associadas entre si em estruturas paralelas, sendo capazes de formar uma matriz contínua após a secagem [16], sendo essa uma

propriedade que favorece a formação de filmes. Análises espectroscópicas e de difração de raios-X sugerem que a molécula de queratina assume a forma α em solução e a forma β em filmes [12].

Os métodos para extrair queratinas de lã e cabelo envolvem a cisão simultânea de ligações peptídicas (hidrólises ácida e básica), redução de pontes dissulfeto com soluções de sulfato de sódio alcalino ou a combinação de tratamentos enzimáticos e químicos com o uso de hidróxido de amônio. Processos sem cisões peptídicas significativas, em que somente pontes dissulfeto são rompidas, incluem sulfitolises ou oxidação de pontes dissulfeto com ácido per fórmico [16]. WOODIN [20] extraiu queratina de penas com uréia, tioglicolato ou bissulfeto de sódio em solução tampão, a diferentes condições de pH (5,8-9,5) com o objetivo de investigar o tamanho molecular, a forma e o conteúdo de cistina/cisteína na molécula de queratina. Seus estudos demonstraram que a razão cistina/cisteína em soluções de uréia e bissulfeto dependem do pH e da concentração de uréia, sendo que a maior razão foi encontrada em pH 8,5.

A importância econômica da produção de lã e o interesse médico no crescimento e reposição de pele e cabelo fizeram da família das queratinas flexíveis e resistentes de mamíferos, uma das classes de proteínas estruturais bastante estudadas. Desde 1934, estudos sobre a insolubilidade da queratina devido à presença de pontes dissulfeto e sua solubilidade quando da quebra das mesmas têm sido relatados [5, 9, 20]. YAMAUCHI *et al.* [22] utilizaram um processo brando para extrair queratina de lã, o qual envolve o uso de tióis, como o 2-mercaptoetanol, para reduzir as

¹Recebido para publicação em 15/8/2005. Aceito para publicação em 28/4/2005. (001592)

²Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina

³Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina
Caixa Postal 476

CEP 88040-900 – Florianópolis (SC)

Fone.: (55) 48-331-9930, Fax: (55) 48-331-9687

E-mail: joao@enq.ufsc.br

pontes dissulfeto em soluções concentradas de uréia em pH moderadamente alcalino. A remoção do 2-mercaptoetanol e da uréia desta solução por diálise resulta na agregação das cadeias polipeptídicas de queratina e na re-oxidação dos resíduos de cisteína, resultando em gel branco e opaco.

As penas de aves são compostas basicamente por 90% de proteína, na forma de queratina, que atualmente vem sendo utilizada, depois de hidrolisadas a altas temperaturas, na formulação de ração animal. Considerando-se que as penas representam de 5 a 7% do peso dos frangos [13] e que o Brasil é o segundo produtor mundial dessa ave, pode-se avaliar a grande disponibilidade da queratina na indústria de processamento de aves. Estudos têm revelado que esponjas e filmes preparados com soluções de queratina reduzida são mecanicamente fortes e insolúveis em água [19].

SCHROOYEN *et al.* [17] estudaram a extração queratina de penas de frango, buscando a otimização do processo. Para tal, realizaram a extração em atmosfera inerte de nitrogênio, em uma faixa de pH de 3,0 a 10,0. Estudaram, ainda, a influência de diferentes concentrações de uréia e temperaturas, bem como a estabilização da solução formada através de modificações químicas ou através da adição de diferentes quantidades de surfactante (lauril sulfato de sódio). As condições para maior rendimento de extração foram pH igual a 9,0, temperatura de 50°C e concentração de uréia de 8 mol L⁻¹.

Algumas proteínas vêm despertando o interesse para a elaboração de filmes, entre as quais destacam-se as proteínas da soja, o glúten, a gelatina, o colágeno e a queratina de lã [3, 8, 10]. Para uma maior utilização da queratina na forma de biofilmes destinados à fabricação de embalagens biodegradáveis e de outros materiais, uma otimização dos métodos de extração e a avaliação das propriedades físico-químicas da queratina extraída se fazem necessárias.

O objetivo deste trabalho foi adequar uma metodologia para extração de queratinas a partir de penas de frango e caracterização dos mesmos quanto à massa molar, perfil de aminoácidos e propriedades térmicas, além da determinação de algumas propriedades dos filmes obtidos.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

As penas de frango foram fornecidas por uma indústria avícola local, com teor de umidade de 10% em massa. Foram utilizados os reagentes: uréia (Nuclear), 2-mercaptoetanol (Vetec), lauril sulfato de sódio (Nuclear), éter de petróleo (Nuclear) e glicerol (Nuclear). As membranas de diálise utilizadas foram da Spectra/Por-1, com corte de 8.000-10.000 g mol⁻¹.

2.1 - Extração da queratina de penas por solubilização com 2-mercaptoetanol

As penas foram previamente lavadas segundo a norma ASTM [2], secadas e posteriormente moídas em moinho de facas marca Tecnal, modelo TE-648. Este material foi

desengordurado com éter de petróleo em um extrator de soxhlet por 12 h.

A solução de queratina foi extraída conforme o procedimento de YAMAUCHI *et al.* [22]. Inicialmente, 45 g de penas foram imersas em 500 mL de solução aquosa contendo uréia 8 mol L⁻¹; lauril sulfato de sódio 0,26 mol L⁻¹ e 2-mercaptoetanol 1,66 mol L⁻¹. A mistura foi mantida sob agitação durante 1 h a pH 9,0, sob atmosfera de nitrogênio e posteriormente filtrada. O filtrado foi dialisado com água destilada durante três dias consecutivos. A dosagem de proteínas foi realizada pelo método colorimétrico do biureto [11]. O processo de extração foi realizado nas temperaturas de 40, 50, 60, 70 e 80°C, para avaliação do efeito da temperatura no rendimento de queratina.

2.2 - Caracterização das proteínas por eletroforese (SDS-PAGE)

Soluções aquosas de queratina extraída foram caracterizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) [21]. As amostras foram desnaturadas a 100°C por 10 min em solução de mercaptoetanol, Tris-HCl 0,5 mol L⁻¹ (pH 6,8), glicerol, SDS 10% (m/v) e azul de bromofenol 0,1% (m/v). A separação das frações foi realizada em gel de poliacrilamida de 12% (m/v), em placas verticais, imerso em solução tampão Tris 0,025 mol L⁻¹, glicina 0,19 mol L⁻¹ e SDS 0,1% (m/v) (pH 8,3). A identificação das frações de proteínas foi realizada por comparação com padrão Sigmamarker com massa molar entre 6.500 e 205.000 g mol⁻¹. A voltagem aplicada foi de 120 V durante 5 h e a coloração das frações foi desenvolvida com o azul coomassie (R-250) [15].

2.3 - Perfil de aminoácidos

A determinação dos aminoácidos da queratina extraída das penas foi realizada de acordo com SPACKMAN, STEIN e MOORE [18]. As amostras foram inicialmente hidrolisadas em meio ácido, com HCl 6 mol L⁻¹ a 110°C por 24 h, em uma coluna de troca iônica, seguida de reação com ninhidrina. As análises foram realizadas usando cromatografia líquida em coluna de fase reversa por HPLC usando o cromatógrafo DX300-Dionex, Sunnyvale, USA.

2.4 - Termogravimetria (TG)

Nas termogravimetrias [TG], as massas de pequenas quantidades de amostra de queratina ou penas previamente desengorduradas (ca. 15 mg) e desidratadas em estufa a vácuo (50°C/24 h) foram monitoradas em um equipamento Shimadzu TGA-50 durante aquecimentos controlados com razão de aquecimento de 10°C min⁻¹, com nitrogênio como gás de purga. As corridas foram feitas da temperatura ambiente até 600°C.

2.5 - Isotermas de sorção de umidade

A determinação das isotermas de sorção de umidade (curva de adsorção) foi realizada pelo método estático.

A queratina foi condicionada em diferentes atmosferas obtidas com várias soluções salinas saturadas. Soluções de NaOH, MgCl₂, K₂CO₃, Mg(NO₃)₂, NaNO₂, NaCl, KCl foram utilizadas para se obter umidades relativas (atividades de água) na faixa de 6 a 96 %. As isotermas foram obtidas nas temperaturas de 25 e 35°C e o modelo de GAB (Guggenheim-Anderson-de Boer) foi utilizado para ajustar os dados experimentais de sorção de umidade. A representação matemática do modelo de GAB, *Equação 1*, foi descrita na literatura como adequada para a representação dos conteúdos de umidade das amostras de filmes de queratina (W) condicionados a diferentes atividades de água (umidades relativas do ar, em decimal) [13].

$$W = \frac{(A.B.C.A_w)}{((1-C.A_w) + (1+(B-1).C.A_w))} \quad (1)$$

Sendo:

A: o conteúdo de umidade (base seca) na monocamada; B: a constante de Guggenheim associada ao calor de sorção na primeira camada; C: a constante associada ao calor de sorção das multicamadas; A_w: a atividade de água (umidade relativa do ar).

2.6 - Preparo e caracterização de filmes de queratina

A queratina extraída foi utilizada para a preparação de filmes pela técnica de espalhamento em placas de poliestireno (*casting*). Para a formação de cada filme, 50 mL de solução de queratina foram utilizadas diretamente ou com a adição de 0,30 g glicerol/g queratina. Todas as soluções foram mantidas sob agitação mecânica constante por 1 h, para promover a homogeneização do glicerol na mistura.

Após essa etapa, a mistura foi espalhada em uma placa de poliestireno de 0,177 m² de área e posteriormente seca a 30°C por 24 h, em estufa com ventilação e renovação de ar. Os filmes foram em seguida removidos das placas e condicionados em dessecadores a 35°C, com umidade relativa igual a 75%, obtida com uma solução saturada de cloreto de sódio. Esse condicionamento foi realizado por pelo menos 48 h, antes da determinação das propriedades dos filmes de queratina. As espessuras médias dos filmes foram calculadas a partir de medidas das espessuras em quatro diferentes pontos do filme, com um micrômetro digital Mitutoyo Co., Japão, com exatidão de ±0.001 mm.

Micrografias dos filmes foram obtidas com um microscópio eletrônico de varredura, Philips XL-30. Para a obtenção das mesmas, as amostras foram cobertas por uma camada de ouro. Todas as micrografias foram obtidas com uma voltagem de aceleração de 10 kV. As propriedades mecânicas de tensão de ruptura e alongamento na ruptura foram determinadas com o analisador de textura TA-XT2 - Stable Micro System - Inglaterra. Os ensaios foram realizados com a velocidade de 0,3 mm/s e a separação

inicial das presilhas foi de 70 mm. Dez corpos de prova de 25 mm de largura e 100 mm de comprimento foram utilizados nos ensaios de tração, para cada formulação usada na preparação do filme. Antes dos ensaios, as amostras foram condicionadas em ambiente com umidade relativa de 75%, obtido com o uso de uma solução saturada de NaCl em um câmara hermética.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apresentam-se, a seguir, os resultados sobre os rendimentos obtidos na etapa de extração de queratina a diferentes temperaturas, assim como o perfil de aminoácidos da solução protéica obtida. A capacidade de sorção de água pela queratina é apresentada a duas diferentes temperaturas. Os resultados das análises termogravimétricas e da eletroforese em gel de poliácridamida são apresentados e discutidos. Resultados preliminares sobre a aplicação da queratina de frango na obtenção de filmes são também apresentados.

3.1 - Extração da queratina

O 2-mercaptoetanol e a uréia, atuando como agentes redutores, promoveram a quebra das pontes de enxofre e das ligações de hidrogênio. O lauril sulfato de sódio foi usado para promover a estabilidade da solução em meio aquoso a pH igual a 9,0, necessário para que ocorra a ativação dos grupos tióis, desfazendo-se as pontes dissulfeto. Sob estas condições foi obtida uma quantidade de queratina com rendimento de aproximadamente 94 %, em relação à massa seca inicial das penas.

Na *Tabela 1*, são relacionadas as quantidades de queratina extraídas de penas de frango, expressas em gramas por mililitro, em função da temperatura de extração. Os resultados indicaram uma tendência de redução do rendimento da extração de queratina com o aumento da temperatura. Isso pode estar associado à potencialização dos reagentes com o aumento da temperatura, que provoca um maior número de ruptura nas ligações, ocasionando a obtenção de moléculas de menor massa molar. As moléculas de massas molares inferiores a 8.000 mol L⁻¹ permeiam a membrana de diálise, levando a uma redução do rendimento efetivo do processo de extração.

TABELA 1 - Influência da temperatura no rendimento da extração de queratina

Temperatura (°C)	Concentração de proteína (mg mL ⁻¹)
40	165
50	130
60	120
70	81
80	115

3.2 - Perfil de aminoácidos

Na *Tabela 2*, apresenta-se o perfil de aminoácidos da queratina extraída de penas de frangos.

triturada nesta faixa de temperatura é três vezes maior do que para a queratina, deve ocorrer a eliminação de componentes presentes na pena triturada que durante o processo de isolamento da queratina são suprimidos.

Por outro lado, acima da temperatura de 200°C, as curvas de DTG apresentam características semelhantes, com picos correspondentes a temperaturas de taxa de decomposição máxima para o filme de queratina, coincidentes com ombros na curva correspondente ao filme de queratina, sugerindo que o mecanismo de decomposição seja o mesmo para as duas amostras estudadas, ou seja, a queratina apresenta a mesma estabilidade térmica na pena ou na forma de filme. YAMAUCHI & YAMAUCHI [21] apresentam dados de termogravimetria de filmes de queratina extraída da lã de ovinos. Os autores relatam que os filmes não fundiram durante o aquecimento e que foi evidenciada a decomposição gradual das amostras a temperaturas superiores a 160°C.

3.5 - Eletroforese em gel de poli(acrilamida)-SDS

As soluções de queratina obtidas a diferentes temperaturas foram submetidas à eletroforese em gel de poli(acrilamida). Os resultados são apresentados na Figura 3.

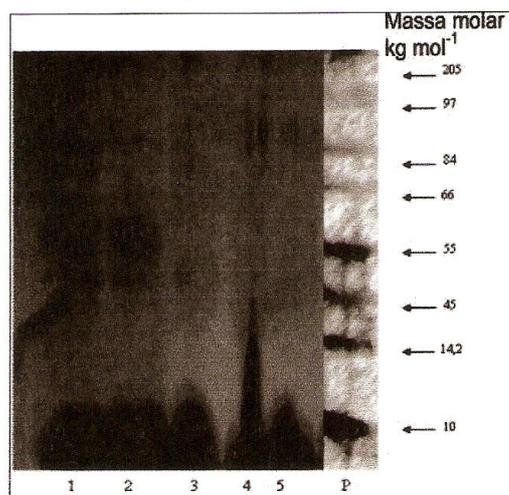


FIGURA 3 – Solução de queratina em gel de poli(acrilamida)-SDS.

As colunas 1-5 representam as soluções de queratina extraída submetidas a diferentes temperaturas de extração, enquanto a coluna P é relativa ao padrão utilizado (Sigmamarker)

As frações de proteínas desenvolvidas no gel mostraram que as diferentes temperaturas de extração tiveram pouca influência sobre a massa molar média da queratina extraída em solução, com maior concentração de proteínas na faixa de 10.000-12.000 g mol⁻¹.

3.6 - Características dos filmes de queratina obtidos

Na Figura 4, são apresentadas as micrografias das superfícies de filmes de queratina preparados sem a adição

de plastificante e com a incorporação de 0,30 g glicerol/g queratina na solução filmogênica, do mesmo modo realizado por YAMAUCHI & YAMAUCHI [21]. A textura da superfície do filme plastificado com glicerol mostrou-se mais homogênea.

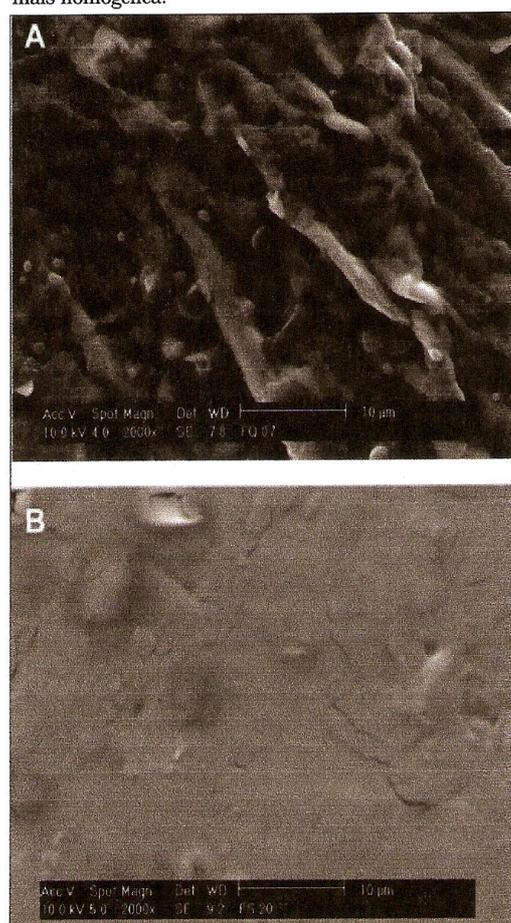


FIGURA 4 – Micrografias de filmes de queratina com aumento de 2.000 vezes: (A) sem plastificante e (B) com 0,30 g glicerol/g queratina

Na Tabela 4, são apresentados os valores das tensões e dos respectivos alongamentos dos filmes na ruptura. Como esperado, a tensão de ruptura diminuiu consideravelmente com a adição do glicerol. Por outro lado, o valor do alongamento médio dos filmes de queratina dobrou com a adição do glicerol na concentração citada acima.

TABELA 4 – Valores da tensão e do alongamento na ruptura dos filmes de queratina obtidos

Concentração de glicerol (g/g queratina)	Tensão de ruptura (MPa)	Alongamento na ruptura (%)
0,00	5,13±0,17	16,25±2,00
0,30	0,45±0,04	31,74±3,46

Os valores absolutos de tensão de ruptura e de alongamento na ruptura dos filmes obtidos são menores do que os valores publicados na literatura sobre filmes de queratina. YAMAUCHI & YAMAUCHI [21] publicaram dados sobre filmes de queratina de lã de ovinos plastificados com 1 g glicerol/g queratina onde a tensão de ruptura dos mesmos variou entre 5 MPa (filmes condicionados a umidade relativa de 85%) e 11 MPa (filmes condicionados a umidade relativa de 65%).

Para as mesmas condições, esses autores relataram que os valores de alongamento na ruptura dos filmes de queratina foram de 32 e 42%. Esses últimos valores foram da mesma ordem de grandeza que os obtidos neste trabalho, embora a concentração de plastificante usada nos filmes de queratina de lã produzidos por YAMAUCHI & YAMAUCHI [21] tenha sido 3,3 vezes maior. As diferenças entre as propriedades mecânicas relatadas acima podem ter diversas explicações, como a distribuição de aminoácidos nas soluções filmogênicas. Nos dois casos, havia uma fração de aminoácidos com massas molares próximas de 15 kg/mol, mas a queratina de lã apresentou também uma fração importante de aminoácidos com massas molares entre 35 e 50 kg/mol, como relatado por YAMAUCHI & YAMAUCHI [21]. Os procedimentos de preparação e secagem dos filmes não foram exatamente os mesmos, o que também pode ter influenciado as propriedades dos filmes.

4 - CONCLUSÕES

A extração da queratina a partir de penas de frango utilizando agentes redutores e surfactantes é viável e apresentou elevado rendimento percentual, da ordem de 94% em relação à massa seca das penas. Diferentes proteínas foram identificadas, utilizando-se eletroforese em gel de poliacrilamida, cuja maior concentração de proteínas apresentou massas molares na faixa de 10.000-12.000 g mol⁻¹.

A queratina extraída apresentou a mesma estabilidade térmica que a queratina nas penas de frango, indicando que o método de extração é adequado para o objetivo de se obter queratina para a produção de filmes que possivelmente sofrerão tratamentos térmicos.

Os valores absolutos de tensão de ruptura dos filmes obtidos foram menores do que os resultados publicados na literatura sobre filmes de queratina de lã de ovinos, mas os alongamentos dos dois tipos de filmes foram da mesma ordem de grandeza.

Deste modo, as técnicas de extração e de obtenção dos filmes se mostraram adequadas e podem ser úteis em estudos complementares visando o aproveitamento diferenciado desse resíduo industrial.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ARAI, K.M.; TAKAHASHI, R.; YOKOTE, Y.; AKAHANE, K. Amino-acid sequence of feather keratin from fowl. **European Journal Biochemical**, v. 32, p. 501-510, 1983.
- [2] ASTM (1997) **Standard Test Methods for Wool Content of Raw Wool**. In: Annual Book of ASTM Standards (1-5). Designation (D584-96). Philadelphia.
- [3] BARRETO, PL.M.; PIRES, A.T.N.; SOLDI, V. Thermal degradation of edible films based on milk proteins and gelatin in inert atmosphere. **Polymer Degradation and Stability**, v. 79, p. 147-152, 2003.
- [4] CUQ, B.; AYMARD, C.; CUQ, J.L.; GUILBERT, S. Edible packaging films based on fish myofibrillar proteins: Formulation and functional properties. **J. Food Sci.**, v. 60, p. 1.369-1.374, 1995.
- [5] DOWLING, L.M.; SPARROW, L.G. Sequences of wool keratin proteins. **Trends Biochem. Sci.**, v. 16, p. 115, 1991.
- [6] FRASER, R.D.B.; MACRAE, T.P.; SPARROW, L.G. Disulphide bonding in α -keratin. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 10, p. 106, 1988.
- [7] FRASER R.D.B. Keratins. **Scientific American**, v. 221, p. 87, 1969.
- [8] GENNADIOS, A.; BRANDENBURG, A.H.; PARK, J.W.; WELLER, C.L.; TESTIN, R.F. Water vapor permeability of wheat gluten and soy protein isolate films. **Industrial Crops and Products**, v. 2, p. 189-195, 1994.
- [9] HEARLE, J.W.S. A critical review of the structural mechanics of wool and hair fibres. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 27, p. 123-138, 2000.
- [10] IRISSIN-MANGATA, J.; BAUDUIN, G.; BOUTEVIN, B.; GONTARD, N. New plasticizers for wheat gluten films. **European Polymer Journal**, v. 37, p. 1.533-1.541, 2001.
- [11] ITZHAKI, R.F.; GILL, D.M.; Micro-biuret method for estimating proteins Anal. Biochem. **Analytical Biochemistry**, v. 9, p. 401-410, 1964.
- [12] KAWANO, Y.; WATANABE, K.; OKAMOTO, S. Characterization of soluble keratin derivatives obtained from chicken feather powders by reduction **J. Agr. Chem. Soc. Jpn.**, v. 49, p. 513-517, 1974.
- [13] MARTELLI, S.M.; LAURINDO, J.B.; MOORE, G.R.P.; GONDOLFO, C.A.P.; PAES, S.S., **LWT-Food Sci. Technol.**, v. 39, p. 292-301, 2006.
- [14] ONIFADE, A.A.; AL-SANE, N.A.; AL MUSALLAM, A.A.; AL-ZAIBAN, S. A review: potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. **Biore-source Technology**, v. 66, p. 1-11, 1998.
- [15] B. SUGDEN, B. DETROY, R. J. ROBERTS AND J. SAMBROOK. Agarose slab-gel electrophoresis equipment, **Analytical Biochemistry**, v. 68, p. 36-46, 1975.
- [16] SCHROOYEN, P.M.M.; DIJKSTRA, P.J.; OBERTHÜR, R.; BANTJES, A.; FEIJEN, J. Stabilization of solutions of feather keratins by sodium dodecyl sulfate. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 240, p. 30-39, 2001.
- [17] SCHROOYEN, P.M.M.; DIJKSTRA, P.J.; OBERTHÜR, R.; BANTJES, A.; FEIJEN, J. Partially carboxymethylated feather keratins. 1. Properties in aqueous systems. **J. Agr. Food Chem.**, v. 48, p. 4.326, 2000.
- [18] SPACKMAN, D.H., STEIN, W.H., & MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. **Analytical Chemistry**, v. 30, p. 1.190-1.206, 1958.

Queratina de penas de frango, Moore *et al.*

- [19] TANABE T., OKITSU N., YAMAUCHI K. Fabrication and characterization of chemically crosslinked keratin films. **Materials Science & Engineering:C**, v. 24, p. 441-446, 2004.
- [20] WODDIN, A.M.; Molecular size, shape and aggregation of soluble feather keratin. **Biochem. J.**, v. 57, p. 99, 1954.
- [21] YAMAUCHI, K., YAMAUCHI, A. In: **Protein based films and coatings**. Gennadios, A., ed.; CRC Press, Boca Raton, p. 253, 2002.
- [22] YAMAUCHI, K.; YAMAUCHI, A.; KUSUNOKI, T.; KOHDA, A.; KONISHI, Y. Preparation of stable aqueous solution of keratins, and physicochemical and biodegradational properties of films. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 31, p. 439-444, 1996.

6 - AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao apoio financeiro fornecido através do projeto Finep/CT-AGRO/FNDCT nº 0.1.02-0104.00. Trabalho do Projeto XI. 20 do Cytel.

ANEXO IV

Obtenção de Biofilmes a partir de Queratina de Penas de Frango

G. R. P. MOORE; S. M. MARTELLI; P. D. ANDREO; C. A. GANDOLFO; R. F. A. MACHADO;
A. BOLZAN; J. B. LAURINDO

Universidade Federal de Santa Catarina

Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos

Caixa Postal 476 – CEP 88040-900 – Florianópolis – SC

e-mail: geovana@enq.ufsc.br, silviammartelli@hotmail.com, patyandreo@zipmail.com.br,
cristhianeantunes@hotmail.com, machado@enq.ufsc.br, abolzan@enq.ufsc.br, joao@enq.ufsc.br

RESUMO

A indústria de processamento de aves produz uma grande quantidade de penas que são usualmente utilizadas na formulação de ração animal. A queratina é uma proteína fibrosa encontrada neste tipo de resíduo, a qual pode ser classificada como um polímero natural tridimensional. O objetivo desse trabalho é a obtenção de filmes biodegradáveis a partir da queratina extraída das penas de frangos, como uma alternativa para agregar valor a este subproduto do processamento. A extração da queratina das penas foi realizada utilizando-se uma solução contendo uréia, mercaptoetanol, surfactante e água a 50°C e pH 9,0. Após essa extração, foi realizada uma filtração, onde os resíduos insolúveis foram separados. O 2-mercaptoetanol e a uréia foram removidos da mistura por diálise, resultando na agregação da cadeia de polipeptídeos de resíduos de cisteína, obtendo-se um gel branco e opaco, que posteriormente foi liofilizado. O teor de proteína foi determinado pelo método do biureto, onde obteve-se 10% p/v. O rendimento percentual de queratina obtido foi de 90%, em relação à massa inicial de penas secas, valor semelhante ao encontrado na literatura. Os filmes foram preparados através de soluções filmogênicas de queratina usando a técnica de “casting”, usando-se o glicerol como plastificante (0,01- 0,09g/g de queratina). Ensaio de tração mostraram que a presença do glicerol diminuiu a tensão de ruptura dos filmes de 16 para 1,28 MPa e aumentou o alongamento dos mesmos de 1,74% para 19,27%. A higroscopicidade dos filmes de queratina, com diferentes concentrações de glicerol foi caracterizada através da determinação experimental de isotermas de sorção de umidade, utilizando soluções salinas saturadas a 35°C. As isotermas de sorção de umidade mostraram que, o conteúdo de umidade nos filmes aumentou com o aumento da concentração de glicerol. Os filmes obtidos mostraram boa resistência mecânica, embora apresentem baixa resistência à umidade.

Palavras chaves: Queratina, penas, filmes biodegradáveis.
