

DESARROLLO DE PRODUCTOS A BASE DE QUERATINA A PARTIR DE RESIDUOS DE LA INDUSTRIA AVÍCOLA

Orjuela-Palacio, Juliana M.¹; Lanari, María C. ¹; Zaritzky Noemí E.^{1,2}

¹ Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA) Fac. de Ciencias Exactas Universidad Nacional de La Plata _ CONICET, 47 y 116 (1900) La Plata, Buenos Aires, Argentina

² Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina
julianaorjuela11@gmail.com

Palabras clave: queratina, aprovechamiento de residuos, plumas, Calorimetria diferencial de Barrido, Espectroscopía infrarroja (FTIR)

INTRODUCCIÓN

La industrialización de aves de corral genera grandes volúmenes de residuos, entre éstos las plumas de difícil degradación y cuya disposición final representa un problema ambiental. Sólo una pequeña proporción se destina para la alimentación animal, siendo un proceso costoso ya que las plumas se deben esterilizar a elevada temperatura y alta presión, luego secarlas y molerlas. El producto obtenido es de baja calidad proteica, con déficit de algunos aminoácidos esenciales y de baja digestibilidad para los animales. Otros métodos como el quemado o enterrado son usados para su disposición final, pero estos son poco amigables con el ambiente. La quema de plumas genera gases que contaminan el aire y para su disposición en rellenos se requieren grandes lotes de tierra siendo su descomposición muy lenta (Fan, X. 2008). Las plumas corresponden al 5-7% del peso del pollo (Schrooyen y col., 2007; Fan, X., 2008), están conformadas por una parte central conocida como raquis, que le sirve de eje y otorga la rigidez necesaria para mantenerla firme; la parte inferior más ancha y rígida por la cual la pluma se une a la piel se denomina Calamus y las barbas son láminas delgadas en posición perpendicular al raquis (Figura 1). Las plumas están compuestas en un 90% de proteína conocida como queratina.

Las queratinas son proteínas fibrosas conocidas como escleroproteínas; son resistentes a los factores físicos, químicos y ambientales y son insensibles al ataque proteolítico enzimático como la tripsina y la pepsina. (Kornilłowicz-Kowalsk y col., 2011). Tienen una gran cantidad de cisteína presente formando el enlace disulfuro del dímero cistina. Estos enlaces se entrecruzan estableciendo una red tridimensional de cadenas polipeptídicas y en conjunto con los residuos hidrófobos hacen que la queratina sea insoluble en agua y en solventes apolares; sin embargo la característica de solubilidad de la proteína puede modificarse realizando cortes sobre los enlaces disulfuro (Schrooyen y col., 2000). Algunos métodos físicoquímicos como el calentamiento de la proteína en algunos solventes orgánicos, como el Dimetilformamida (DMF) y Dimetilsulfoxido (DMSO) han sido usados para obtener queratina soluble. (Kornilłowicz-Kowalska y col.; 2011).

En la actualidad, el interés por el desarrollo de productos sostenibles ambientalmente a partir de proteínas de desechos, está incrementando. (Schrooyen y col., 2000).

Las aplicaciones de los productos derivados de la queratina a nivel cosmético y farmacéutico son muy amplias; también han surgido otros usos como componente de varias clases de compuestos y en tejidos biodegradables. Las características de este tipo de proteína la hacen apropiadas para la manufactura de fibras para usos textiles con aplicaciones médicas y sanitarias. (Kornilłowicz-Kowalsk y col., 2011).

El objetivo de este trabajo es obtener productos a base de queratina a partir de residuos de la industria alimentaria (plumas de pollo) con alto valor agregado, contribuyendo a la disminución de la contaminación ambiental causada por dicho residuo.

MATERIALES Y MÉTODOS

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

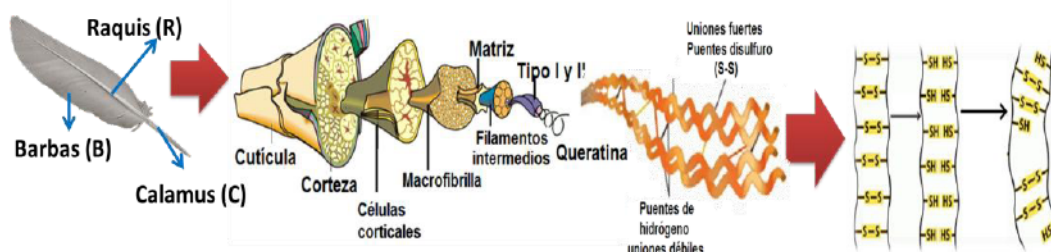


Figura 1. Esquema de la estructura de la queratina

Adecuación de las plumas de pollo: Las plumas congeladas se lavaron con agua corriente a 40°C y detergente común con agitación constante, retirando el material extraño (palos, piedras, restos de tejidos, picos, fibras, etc.), se realizó un lavado final con una mezcla de agua-etanol 96% (50:50) con el fin de retirar cualquier residuo de detergente. Posteriormente escurrieron y filtraron con malla cribada y lienzo para luego secarlas en estufa por 24 hs a 30°C. Las plumas lavadas y secas se cortaron, molieron y se desengrasaron con Éter de petróleo (10 mL/g de pluma seca) con agitación constante por 4 hs; se filtraron con lienzo y se dejaron bajo campana a temperatura ambiente por 2 hs para remover el exceso de solvente; finalmente se secaron en estufa a 30°C por 24 hs.

Fragmentación de las plumas: Las plumas lavadas y secas se dividieron manualmente en sus diferentes partes: Raquis (R), Calamus (C) y Barbas (B).

Solubilización de plumas de pollo: Para la extracción de la queratina a partir de las plumas de pollo se realizaron 3 métodos de solubilización. El primero se basó en una hidrólisis alcalina con una solución de sulfuro de sodio (Na_2S) como agente reductor, el cual actúa rompiendo los enlaces disulfuro de la proteína. En 1L de solución alcalina de Na_2S 0.1 M se disolvieron 40 g de plumas a 60°C por 1 h con agitación constante, ajustando el pH a 12.5 (H1). (Schrooyen y col., 2007).

El segundo método se realizó según el protocolo propuesto por Wrzesniewska-Tosik y col., 2007. Para la disolución de las plumas se usó una solución alcalina de Hidróxido de Sodio (NaOH 5%). La solución proteica (H2) fue filtrada y almacenada de la misma forma en que se realizó H1.

En el tercer método de solubilización (H3) de las plumas de pollo, se usó como agente reductor 2-mercaptoetanol para romper los enlaces disulfuro (-S-S-) de la proteína (Schrooyen y col., 2000). 40 g de plumas adecuadas se disolvieron en una solución que contenía 8 M de Urea, 3 mM de EDTA, 125 mM de 2-Mercaptoetanol en un buffer tris 0.2 M a pH 9.0 por 1 h a 60°C con agitación constante. La solución proteica obtenida (H1) se filtró con lienzo para retirar los residuos de plumas no disueltas y se almacenó a 4°C (Schrooyen y Oberthur; 2007). El procedimiento fue el mismo que el realizado con H1 y H2.

Todas las soluciones proteicas obtenidas se dializaron para eliminar el exceso de reactivos adicionados. Se usó membrana de celulosa de 16 mm de diámetro con retención de peso molecular >12000 Da (D9777 SIGMA-Aldrich, Argentina), sumergiéndolas en agua destilada a temperatura ambiente por 24 hs con varios cambios de agua.

Extracción de Queratina: Las soluciones dializadas se llevaron a pH 4.2 correspondiente al punto isoeléctrico de la proteína, usando ácido clorhídrico (HCl; 2N) con el fin de precipitarla (Schrooyen y col., 2007; Wrzesniewska-Tosik y col., 2007). Luego, se centrifugó por 15 minutos a 10°C y 6500 rpm; los pellets obtenidos se lavaron con agua destilada y se liofilizaron.

Modificación Química de Queratina: La modificación química de las proteínas se utiliza con el fin de mejorar las propiedades funcionales. La reacción de reducción para obtener derivados de queratina es reversible y por lo tanto se puede producir la reformación de enlaces disulfuro (-S-S-) a nivel inter e intramolecular formando agregados de proteína insolubles. La modificación parcial de los grupos -SH libres, generalmente involucra una conversión química de dichos grupos en otros. Uno de los propósitos de la modificación es impedir que los grupos -SH modificados vuelvan a formar los enlaces disulfuro inter e intramoleculares, minimizando la formación de agregados insolubles de queratina. La oxidación de la cisteína a ácido cisteico usando ácido perbórmico o la conversión de cisteína a S-sulfocisteína por sulfitolisis han sido usadas para obtener productos solubles. Se realizaron 2 tipos de modificaciones químicas, acetilación y sulfitolisis oxidativa, con el fin de prevenir la reformación de los puentes disulfuros en los diferentes productos de queratina obtenidos por las 3 hidrólisis.

1. **Acetilación de Queratina (Ac):** Esta modificación se basa en la alquilación de los grupos sulfhídricos con un compuesto órgano-halogenado para evitar la reformación de los puentes disulfuro. Se utilizó Ácido Monocloroacético (MCA; ClCH₂COOH), el grupo -COOH de éste reacciona con los grupos -SH libres de la queratina reducida dando como producto S-Carboximetil-queratina (SCMQ).

Se adicionó 0.5 g de MCA por cada 100 ml de solución de queratina, ajustando el pH a 9, se agitó constantemente por 1 hora a una temperatura de 25°C. Las soluciones de queratina modificada (H1Ac, H2Ac y H3Ac) se dializaron, precipitaron, centrifugaron y liofilizaron en las mismas condiciones mencionadas anteriormente para H1, H2 y H3.

2. **Sulfitolisis Oxidativa (Sox):** La queratina solubilizada fue oxidada con un agente oxidante como el peróxido de hidrogeno. Por este proceso se oxidan los residuos cistina/cisteína a grupos ácidos cisteicos, obteniendo una queratina completamente modificada. (Schrooyen y col, 2007; Florido Rodríguez, 2008). En la sulfitolisis el ion sulfito reacciona por medio de un ataque nucleofílico al puente disulfuro, produciéndose un mol de mercaptano y una mol de SO₃Na.

Se adicionaron 2 ml de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) a 100 ml de cada solución de queratina (H1, H2 y H3), se agito constantemente por 24 hs a 37°C. Posteriormente se agrego 2 g de Sulfito de Sodio, ajustando el pH a 9 y se agitó por 1 h más. A las 3 soluciones de queratina modificada (H1So, H2So y H3So) obtenidas se les realizó el mismo procedimiento usado para obtener los derivados liofilizados H1, H2 y H3.

En la Figura 2 se muestra un esquema de la obtención de los 9 derivados liofilizados de queratina a partir de plumas de pollo.

Calorimetría Diferencial de Barrido: Las plumas, las Barbas, Raquis y Calamus previamente adecuados y los derivados de queratina liofilizados obtenidos se analizaron en un equipo DSC 2010, TA Instruments. Entre 1-5 mg de muestra fueron colocados dentro de una cápsula hermética de aluminio, estas fueron calentadas a 10°C/min de 30 a 300°C. Se usó una capsula vacía como referencia. Después de terminar las corridas, las cápsulas se perforaron sobre la tapa y se llevaron a estufa a 130°C por 3 hs o hasta peso constante.

Espectroscopía infraroja con Transformada de Fourier (FT-IR): Los polvos de los derivados de queratina se trituraron con Bromuro de Potasio purificado y se comprimió hasta formar una pastilla traslúcida por la cual se hizo incidir la radiación IR. Los espectros infrarojo con la transformada de Fourier (FTIR) de los derivados queratina desarrollados en el presente trabajo fueron obtenidos con un espectrofotómetro IR (Vertex 70, Bruker, Alemania), en un rango de 4000 a 400 cm^{-1} . Para cada muestra se colectaron 60 barridos con una resolución de 4 cm^{-1} que fueron acumulados. Para generar el promedio correspondiente a cada muestra los datos obtenidos se procesaron utilizando el software OPUS (OPUS, Bruker Optics, USA).

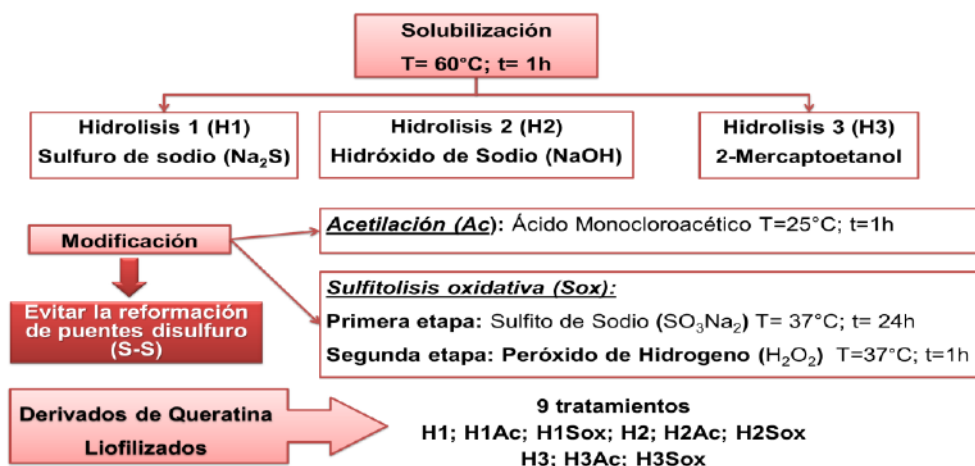


Figura 2. Esquema de obtención de derivados de queratina a partir de plumas de pollo.

Determinación de proteína soluble: El porcentaje de proteína soluble se determinó por el método colorimétrico de Biuret que se basa en la formación de un complejo coloreado entre el Cu^{2+} y los grupos NH de los enlaces peptídicos en medio básico. La intensidad de coloración es directamente proporcional a la cantidad de enlaces peptídicos.

Los derivados liofilizados de queratina (H1, H1Ac, H1Sox, H2, H2Ac, H2Sox, H3, H3Ac y H3Sox) se suspendieron (0.5% p/v) en buffers Tris:HCl 0.03M para proporcionar un rango de pH 7, 8 y 9; las suspensiones se almacenaron a 20°C por 2 meses. El porcentaje de proteína soluble se midió durante el almacenamiento (0, 3, 5, 8, 10, 15, 20, 30, 45 y 60 días). Para la determinación las suspensiones se agitaron por 30 minutos, posteriormente se centrifugaron a 13000 rpm, por 10 min. Se tomó 0.3 ml del sobrenadante se adicionó 0.2 ml de agua destilada y 2 ml de Reactivo Biuret, se agitó en vortex 30 seg, después de 15 min de reacción se midió la absorbancia a 550 nm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron 9 derivados de queratina liofilizados a partir de plumas de pollo. Los rendimientos fueron del 20-40%, siendo mayor para los productos obtenidos con mercaptoetanol sin modificaciones (H1). El porcentaje de proteína soluble inicial derivados de queratina liofilizados en medios acuosos para el pH 7, 8 y 9 varió entre 0% para aquellos que no fueron modificados (H1, H2 y H3) a 13.25% para los derivados modificados. H1Sox presentó el porcentaje mayor de proteína para pH 7 (13.18%); H2Ac para pH 8 (13.25%) y H1Sox para pH 9 (9.61%), mostrando que las modificaciones químicas introducidas aumentan la solubilidad. Se observó un menor solubilidad de los derivados liofilizados de queratina a pH= 9.

Análisis por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Se analizó por DSC los diferentes derivados de queratina obtenidos (H1, H1Ac, H1Sox, H2, H2Ac, H2Sox, H3, H3Ac y H3Sox) presentando temperaturas de desnaturalización superiores a 150°C, lo que sugiere una alta estabilidad térmica. Se observó variabilidad entre las muestras; para comprobarlo la pluma se separó en sus 3 partes (Barbas, Calamus y Raquis) y se obtuvieron los derivados de queratina; estos se analizaron por DSC observándose menor variabilidad para las muestras.

En la Figura 3 se muestran el termograma del Calamus seco y molido y los derivados liofilizados obtenidos a partir del mismo con la hidrólisis con Na₂S y las dos modificaciones químicas (H1, H1Ac y H1Sox). La temperatura de desnaturalización se encuentra en el rango de 195-200°C para el Calamus y sus derivados. Se observan picos endotérmicos mayores para los derivados liofilizados modificados y sin modificar, evidenciando una menor entalpía para el Calamus molido y seco. Takahashi y col., (2004) reportaron que la baja entalpía que presenta el Calamus molido y seco se debe a que posee un alto contenido de componentes amorfos

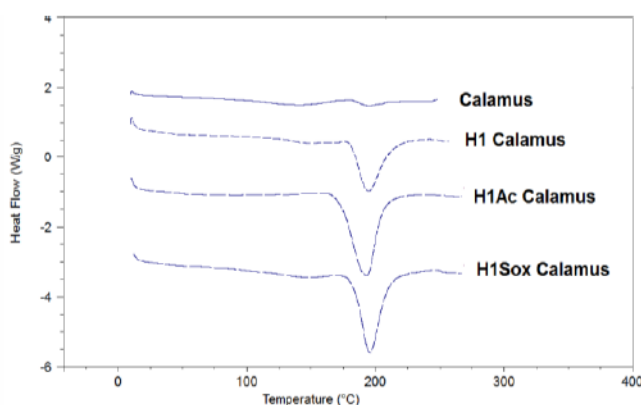


Figura 3. Termogramas DSC para Calamus y los derivados de queratina obtenidos a partir del mismo.

Espectroscopía infraroja con Transformada de Fourier (FT-IR):

Los espectros FTIR en Absorbancia (Figura 4) presentaron picos característicos de Amida A (3292; 3284 cm⁻¹) correspondientes al estiramiento simétrico del enlace N-H asociados con las regiones de la proteína ordenadas en forma α-hélice, Amida B (3082; 3074 cm⁻¹), señal en 2930-2933 cm⁻¹ asociada a la vibración CH₃ (Pielesz y col., 2000; Martínez-Hernández, y col., 2005).

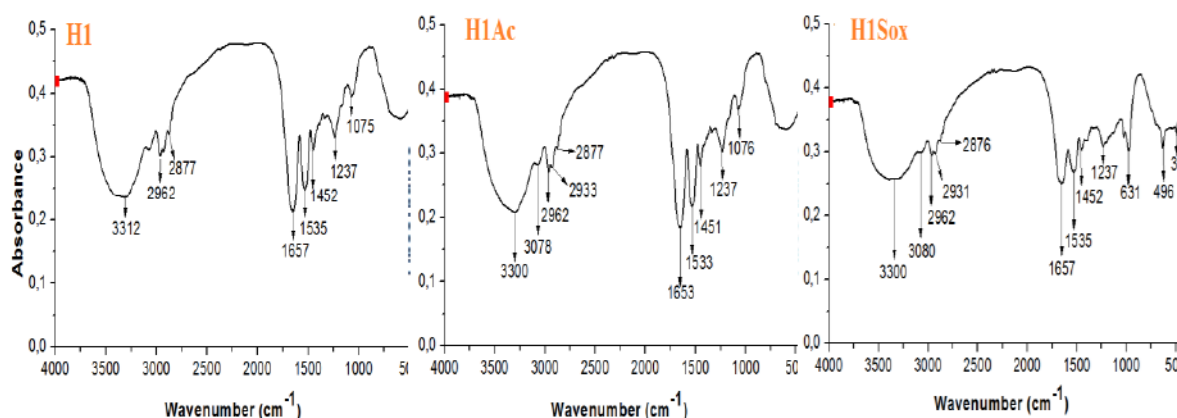


Figura 4. Espectros FTIR de derivados de queratina (H1; H1Ac y H1Sox)

Una banda a $1653\text{-}1657\text{ cm}^{-1}$ relacionada con la vibración del enlace C=O de la Amida I en coincidencia con Martínez-Hernández, y col. (2005) quienes reportaron una fuerte banda a 1652 cm^{-1} relacionada con la vibración de la banda C=O, mostrando conformación α -hélice. Wojciechowska y col., (1999), también reportaron que la banda Amida I está relacionada con las vibraciones de C=O y puede ser encontrada en la región de $1600\text{ a }1690\text{ cm}^{-1}$. Amida II ($1535\text{-}1536\text{ cm}^{-1}$) está relacionada con la flexión del grupo N-H correspondiente a la conformación de hoja plegada β ; la banda que presentan los derivados de queratina a 1237 cm^{-1} puede ser asignada a la Amida III que se encuentra en el rango $1236\text{-}1240\text{ cm}^{-1}$; Martínez-Hernández, y col. (2005) reportó que la región entre $1230\text{-}1240$ puede ser asignada a la estructura de beta-hoja de la amida III, mientras la banda cercana a 1174 resulta de $\nu(\text{C-C})$ y corresponde con aminoácidos de cadena lateral.

La presencia de estas bandas permite confirmar que el compuesto obtenido corresponde a queratina.

CONCLUSIONES

La obtención de productos a base de queratina a partir de residuos industriales contribuye a la sostenibilidad de la cadena alimentaria generando materiales de interés con un mayor valor agregado. Los trabajos continúan actualmente con el estudio de aplicaciones tecnológicas de los productos obtenidos y analizando su estabilidad en el tiempo.

REFERENCIAS

- Akhtar, W. y Edwards, H.G.M. (1997). Fourier-transform Raman spectroscopy of mammalian and avian keratotic biopolymers', *Spectrochim. Acta Part A, Mol Biomol Spectrosc*, 53, 81–90.
- Itzhaki R. y Gill, D.M. (1964) A micro-biuret method for estimating proteins. *Analytical biochemistry*, 121, 401-10.
- Fan, X. (2008). Value-added products from chicken feather fibers and protein. Auburn University. Doctor of Philosophy: 274.
- Jacques, C. (2003). Etude de la valorisation des déchets d'origine keratinique par voie thermomecanochimique en vue de l'obtention de filaments continus: cas spécifique de la lanie. *Sciences des agroressources, l'institut national polytechnique de toulouse*. Doctor: 291.
- Kornillowicz-Kowalska Teresa, Bohacz. J. (2011). "Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects." *Waste Management* 31: 1689-1701.
- Martínez-Hernández, A.L.; Velsco-Santos de Icaza, M. y Castaño, V.M. 2005. Microstructural characterisation of keratin fibres from chicken feathers. *Int. J. Environment and Pollution*, 23 (2), 162-177.
- Pieliesz, A., Wlochowicz, A. y Binias, W. (2000). The evaluation of structural changes in wool fibre keratin treated with azo dyes by Fourier transform infrared spectroscopy', *Spectrochim. Acta Part A, Mol Biomol Spectrosc*, 56, 1409–1420.
- Schrooyen, P.M., Dijkstra, P, Oberthur, R Bantjes, A y Feijen, J. (2000). Partially caroxymethylated feather keratins. 1. Properties in aqueous systems. *J. Agric. Food Chem.* 48, 4326.
- Schrooyen, P.M., Dijkstra, P, Oberthur, R Bantjes, A y Feijen, J. (2001). Partially carboxymethylated feather keratins. 2. Thermal and mechanical properties of the films. *J. Agric. Food Chem.* 49, 221.
- Schrooyen, P.M. y Oberthur, R. (2007). Keratin-based products and methods for their productions. *Nederlands, Stichting Nederlands Instituut voor Zuivelonderzoek*.
- Takahashi, K.; Yamamoto, H.; Yokote, Y. y Hattori, M. (2004). Thermal Behavior of fowl feather keratin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68 (9), 1875-1881.
- Wrzesniwska-Tosik, K. y Adamiek, J. (2007). Biocomposites with a content of keratin from chicken feathers. *Fibres and textiles in Eastern Europe*. Vol 15 N° 1(60) 106.