

PELÍCULAS BIOCOPUESTAS DE QUITOSANO-QUERATINA APLICADAS EN EL CONTROL DE LISTERIA MONOCYTOGENES EN CARNE BOVINA

Orjuela-Palacio Juliana^a, Pérez-Calderón, John^a, Giménez, Belén^a, Zaritzky Noemí^{a,b}

^aCentro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos CIDCA (UNLP-CONICET-CIC). La Plata, CP: 1900, Argentina.

^bDepto. de Ingeniería Química- Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, CP: 1900, Argentina.

juliana.orjuela@ing.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

A nivel global la relevancia de los biomateriales sigue en auge como respuesta al impacto ambiental negativo que dejan los residuos de materiales plásticos no degradables y de un solo uso. Asimismo, son una alternativa para la reconversión de diferentes biomásas generadas como residuos por diferentes tipos de industrias del sector agroindustrial. La queratina (K) es una proteína presente en diferentes biomásas entre las que se destaca las plumas de pollo generadas en grandes volúmenes por la industria avícola y su disposición final tiende a ser el quemado o enterrado. Es considerada un biopolímero que se caracteriza por ser insoluble en solventes polares debido al alto contenido de enlaces disulfuro que sujetan las cadenas poliméricas para formar la estructura 3D [15]. El quitosano (Qs) es un biopolímero catiónico lineal de aminopolisacáridos obtenido a partir de la quitina presente en residuos del sector pesquero; es biodegradable, con alta capacidad antimicrobiana, de fácil aplicación y ambientalmente amigable [8]. Ambos biocompuestos son ampliamente usados para el desarrollo de nuevos materiales como fibras, películas, recubrimientos, esponjas, filtros con aplicaciones ambientales, farmacéuticas, alimentarias, etc.

Por otra parte, los cambios en las costumbres alimentarias de la población y la necesidad de mayor distribución de alimentos listos para comer, poco cocidos o crudos generan una problemática por la posible presencia de microorganismos de deterioro, los cuales pueden generar efectos adversos para la salud del consumidor. Uno de los microorganismos más peligrosos es la *Listeria Monocytogenes*; una bacteria patógena anaerobia facultativa Gram-positiva que ha sido aislada en diferentes alimentos incluyendo la carne cruda y procesada; causa graves alteraciones en la salud humana incluyendo listeriosis, meningitis y gastroenteritis que incluso pueden llevar a la muerte [3]. Este microorganismo tiene una gran capacidad para soportar condiciones severas de procesamiento como temperaturas bajas y altas, alta concentración de sal, atmósferas modificadas y actividad de agua reducida. Se adhiere a diversas superficies en contacto con los alimentos, formando biopelículas, y ciertas cepas se han adaptado a desinfectantes para que pueda subsistir en las industrias de procesamiento de alimentos, siendo esta una posible contaminación continua de los alimentos durante el procesamiento [3]. Diversas tecnologías han sido desarrolladas para el control e inhibición de *L. Monocytogenes* como la aplicación de luz UV [10], Ozono [3]. También se han desarrollado materiales formulados por polímeros incluyendo el Qs [5]. Resulta de interés la combinación los biopolímeros Quitosano/Queratina como propuesta el desarrollo de biomateriales que puedan contribuir al control de patógenos y presentes en alimentos sean a su vez una oportunidad para la reconversión de biomasa generadas por sectores industriales.

El objetivo de este estudio fue formular películas combinando la queratina y el quitosano, además de caracterizar el biomaterial obtenido y evaluar su aplicación como separadores cárnicos para el control de *L. Monocytogenes* en carne bovina cruda. La novedad del trabajo radica en el desarrollo de un nuevo material híbrido, complementando las propiedades de cada uno de los constituyentes generando el mejoramiento de las propiedades fisicoquímicas usando biopolímeros obtenidos de residuos agroindustriales, aplicando una metodología simple y económica; que pueda ser implementado en el diseño de envases para el control microbiano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Formulación de películas biocompuestas de Quitosano y Queratina

Se formularon películas biocompuestas usando quitosano (Qs) como fase continua y queratina (K) como fase dispersa/material de relleno. Se partió de solución polimérica de Qs al 2 % (p/v) y K_i obtenida por método de hidrólisis alcalina con Hidróxido de sodio (NaOH; 5 %m/v) y secado por liofilización [9]. La solución filmogénica consistió en mezclas de los biopolímeros Qs/ K_i en proporción 70:30 (m:m), agitando constante durante 24 horas a 30 °C. Las películas se realizaron por la técnica de secado por moldeo (24 h a 35 °C) (Figura 1). Como muestra control se usaron películas formuladas únicamente con Qs(2 % p/v). Se aplicó una etapa de curado térmico a 120°C durante 30 min. Las películas se almacenaron a 65%HR y 20 °C hasta su uso.

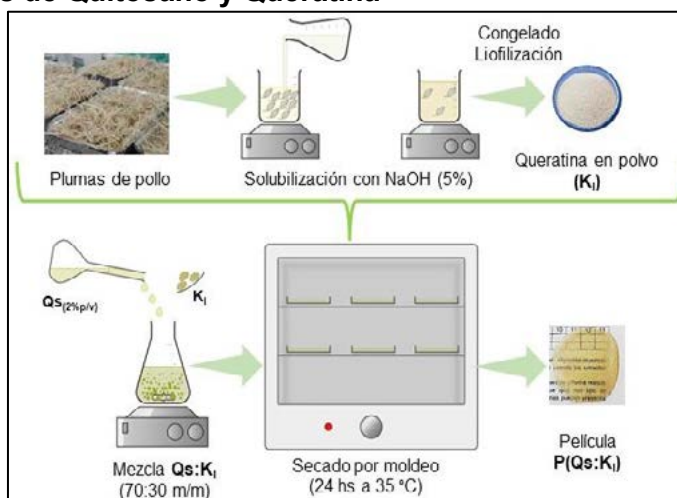


Figura 1. Esquema de formación de películas P(Qs/ K_i) mediante técnica de secado por moldeo.

Caracterización fisicoquímica de las películas P(Qs/ K_i)

Contenido de humedad y actividad acuosa (a_w): El contenido de humedad de las películas se determinó gravimétricamente a 105±1°C hasta alcanzar peso constante. El porcentaje de humedad (H%) se calculó mediante la ecuación $H\% = ((P_i - P_s)/P_i) * 100$ (Eq. 1), donde, P_i es el peso inicial de la película (g) y P_s es el peso seco final (g). La actividad acuosa (a_w) de las películas se midió con un equipo AquaLab Series 4TEV, (Decagon Device, USA).

Propiedades relacionadas con la afinidad por el agua: El porcentaje de hinchamiento ($H_c\%$) y el porcentaje de pérdida de peso ($P_p\%$) de las películas control P(Qs(2% p/p)) y biocompuestas P(Qs/ K_i) se determinó a pH 7,4 para simular condiciones fisiológicas. Se pesaron fragmentos de películas de 2 cm x 2 cm previamente acondicionadas a 33 % HR por 7 días y se sumergieron en 50 mL de buffer PBS a pH 7,4; se mantuvieron a 25°C y agitación constante durante 1 h en un agitador orbital Barnstead Lab-Line (Modelo SHKA4000-1CE). Al finalizar, se recuperó el fragmento y se registró el peso húmedo (m.h). Los fragmentos recuperados se secaron a 105 °C por 8 h. Se calculó el $H_c\%$ y $P_p\%$ mediante las ecuaciones:

$$H_c\% = \left(\frac{m_w - m_0}{m_0} \right) \times 100 \quad (\text{Eq.2})$$

$$P_p\% = \left(\frac{m_0 - m_d}{m_0} \right) \times 100 \quad (\text{Eq.3})$$

donde, m_0 corresponde a la masa inicial del fragmento de película, m_h a la masa del fragmento de película húmedo y m_s a la masa del fragmento de película seco (peso final).

Para determinar si las películas P(Qs/ K_i) liberan proteína en medio acuoso a 7,4, se utiliza el buffer filtrado del ensayo previo y la concentración de proteína soluble se determinó mediante el método espectrofotométrico de Biuret. La absorbancia se leyó a una longitud de onda $\lambda = 550$ nm.

Hidrofobicidad superficial y permeabilidad al vapor de agua: Se determinó la hidrofobicidad superficial de las películas a 25 °C con un goniómetro Ramé-Hart modelo 550 (Ramé-Har Instrument Co, USA), los resultados son el promedio de 10 repeticiones. La permeabilidad al vapor de agua (PVA) se determinó colocando las películas en una celda acrílica de permeabilidad a

20°C y 60 %HR hasta alcanzar el estado estacionario, registrando la variación de peso durante 9 h [1].

Color y propiedades ópticas: se evaluaron las variaciones de color de las películas con un colorímetro triestimula (Minolta CR-400; Minolta Co., USA). Se calculó el índice de saturación (IS), ángulo Hue (HA) e índice de pardeamiento (IP) con las ecuaciones:

$$IS = \sqrt{(a^{*2} + b^{*2})} \text{ (Eq.4); HA} = \tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \text{ (Eq.5); IP} = \frac{\left[100 \left(\frac{a^* + 1,75L}{5,645L + a^* - 3,012 b^* - 0,31} \right) \right]}{0,172} \text{ (Ec.6)}$$

Las propiedades ópticas fueron determinadas midiendo los espectros UV-VIS de 200 a 800 nm con un lector de placas Sinergy HT (BioteK, USA). La **opacidad** (UA nm⁻¹) se determinó mediante la integración debajo de la curva entre 400 y 700 nm, la **transparencia** (A₆₀₀mm⁻¹) usando la relación entre la absorbancia a 600 nm y el espesor de las películas y la barrera UV (UANm⁻¹) mediante la integración debajo de la curva entre 200 y 400 nm.

Propiedades mecánicas: Se determinaron usando un textuómetro TA, XT2i (Stable Micro Systems, Inglaterra), equipado con un sistema de agarre de tensión A/TG. los resultados se analizaron utilizando Texture Expert V, 1,22 software.

Propiedades térmicas: Se evaluó las propiedades térmicas de las películas mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) con un equipo DSC Q100 (TA Instruments, USA), la velocidad de calentamiento aplicada fue 10°C/min y la rampa de 0 a 300 °C. Los termogramas se analizaron para evaluar los picos y entalpías de fusión. Se realizó el análisis termogravimétrico (TGA) (Thermo Plus EVO2, Japón) la velocidad de calentamiento fue 10 °C/min hasta 700 °C.

Análisis de la microestructura y morfología: La caracterización morfológica de P(Qs/K_i) fue analizada por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM) usando un microscopio FEI modelo Quanta 200 (The Netherlands). Los espectros infrarrojos (FTIR-ATR) de PQs(2%p/p) y P(Qs/K_i) se obtuvieron con un espectrómetro Nicolet IS10 (Thermo- Scientific) (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA) con accesorio de ATR (diamante) en un rango 4000 a 400 cm⁻¹. Por muestra se colectaron 60 barridos (resolución= 4 cm⁻¹).

Aplicación en el control de *L. monocytogenes* en carne vacuna: La actividad antimicrobiana para el control de *L. monocytogenes* se evaluó en dos etapas:

a) Evaluación *in-vitro* (Difusión en disco): Se inocularon con 1 mL de la suspensión 10⁸ UFC/mL de la cepa L261 (provista por la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP) cajas de Petri (D= 90 mm) que contenían medio PALCAM con suplemento selectivo para *Listeria*. En cada caja se colocaron equidistantemente 3 discos de película sobre el medio inoculado, se incubaron a 37 °C por 24-48 h y se midieron los halos de inhibición formados usando programa *Image J*.

b) Almacenamiento en frío: En la segunda etapa se almacenaron sistemas carne-película, conformados por un cilindro de carne (D= 3 cm; e= 1 cm) que fue inoculado con 100 µL de L261 (10⁶ UFC/mL) y discos de películas aplicados en cada cara, se almacenaron a 4°C por 7 días. Se evaluó el desarrollo microbiano a 0, 3, 5 y 7 días, los recuentos se realizaron en placa agar PALCAM con suplemento selectivo e incubados a 37°C por 24-48 h.

Análisis estadístico: Se realizó el correspondiente análisis estadístico de varianza mediante ANOVAS con el software Infostat v. 2013 (Grupo InfoStat, FCA, Argentina), las diferencias se compararon mediante la prueba de Fisher usando un nivel de significancia α= 0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron películas compuestas biodegradables a partir de queratina obtenida de residuos de la industria avícola y quitosano.

Propiedades relacionadas con la afinidad por el agua: P(Qs/K_i) exhibió un menor Hc% ($p < 0,05$, Tabla 1) y se registró una mínima liberación de proteína al medio acuoso, indicando que la incorporación de K_i y el curado generó una matriz más estable en medio acuoso; esto podría explicarse por las reacciones de entrecruzamiento del polímero que experimentan los biopolímeros [14; 13; 11]; el entrecruzamiento fue promovido por un proceso físico sin el uso de agentes de entrecruzamiento convencionales como formaldehído, glioxal y glutaraldehído [4,7], siendo el curado térmico es una alternativa al generar materiales compatibles.

Tabla 1. Propiedades relacionadas con la afinidad por el agua, propiedades ópticas y parámetros de color de las películas biocompuestas P(Qs/K_i) y control P(Qs(2%)).

Parámetros	P(Qs(2%))	P(Qs/K _i)
%H (b.h)	23,78 ^b	17,62 ^a
a _w	0,5237 ^{n.s}	0,5223 ^{n.s}
Hc%	232 (38) ^b	105(30) ^a
W _L %	9 (1) ^{n.s}	10 (4) ^{n.s}
mg _{proteína liberada/ g película}	N.M	0.3 (0.1)
IS	12,2 (0,2) ^a	30 (1) ^b
HA	-1,46 (0,01) ^a	1,51 (0,02) ^b
IP	11,7 (0,3) ^a	48,1 (2,9) ^b
Transparencia (Abs ₆₀₀ · mm ⁻¹)	2,8 (0,4) ^a	6,8 (0,3) ^b
Opacidad (AU nm ⁻¹)	76,3 (0,8) ^a	127,5 (2,3) ^b
Barrera-UV (AU nm ⁻¹)	125,8 (4,3) ^a	173,3 (1,8) ^b
Angulo de contacto (°)	87,8 (6,5) ^a	97,1 (3,2) ^b
WVP x 10 ⁻¹¹ (g/m. s. Pa)	8.5 (1,2) ^b	4.7(0.8) ^a

Los valores informados corresponden al promedio y desviación estándar (entre paréntesis). Los diferentes superíndices indican diferencias significativas entre los valores de la fila (prueba de comparación LSD de Fisher, $p < 0,05$). n.s = No significativo; N.M: No medido

Hidrofobicidad superficial y permeabilidad al vapor de agua: El ángulo de contacto (θ) permite caracterizar la hidrofobicidad de las películas, de $10^\circ < \theta < 90^\circ$ indican que el material presenta una aparente hidrofobicidad superficial y de $90^\circ < \theta < 150^\circ$ es característico de materiales hidrófobos [6]. P(Qs/K_i) tuvo $87,8^\circ$ indicando que es susceptible de humectarse debido a la presencia de fracciones de queratina nativa (no modificada) por la presencia de grupos polares como los tioles (SH) [6], la aplicación del tratamiento térmico de curado mejora la característica hidrofóbica del material debido al reordenamiento molecular promovido por el proceso físico de entrecruzamiento [13]. La permeabilidad al vapor de agua (PVA) es un parámetro importante en la caracterización de las propiedades de barrera de los materiales con aplicaciones de envasado de alimentos. La reducción de PVA de P(Qs/K_i) (Tabla 1) se debe al efecto de carga de "relleno" estructural proporcionado por K_i y el curado térmico que genero un material con menor higroscopicidad debido a las reacciones de reticulación estructural que reorganizan la matriz, aumentando la tortuosidad del vapor de agua. Películas formuladas a base de queratina han mostrado altos valores de permeabilidad debido al uso de plastificantes que mejoran las propiedades mecánicas a expensas de generar materiales altamente hidrofílicos.

El valor medido para $P(Qs/K_i)$ fue significativamente inferior a los reportados por varios autores [17; 16; 13; 12]; el uso de Qs permitió desarrollar un buen material compuesto sin necesidad de plastificante siendo efectivo como fase portadora de queratina.

Color y propiedades ópticas: los parámetros HA, IS e IP de $P(Qs/K_i)$ aumentaron respecto de $P(Qs_{(2\%)})$ ($p < 0,05$; Tabla 1), presentan una tendencia a los colores marrón amarillento oscuro debido a las reacciones que pueden suceder durante el proceso de curado a altas temperaturas [14; 11]. $P(Qs/K_i)$ resultó en un material menos transparente y más opaco, no permite que la luz visible penetre apreciablemente en comparación con $P(Qs_{(2\%)})$ (Tabla 1). $P(Qs/K_i)$ fue la que presentó el mayor valor de barrera UV, el agregado de K_i el proceso de curado térmico mejora las propiedades de barrera UV, esto pudo deberse a que K_i proporciona la existencia de grupos funcionales que absorben la radiación UV [2].

Propiedades mecánicas: Las películas formuladas exclusivamente con K tienen malas propiedades mecánicas siendo necesario el uso de un plastificante. $P(Qs/K_i)$ son flexibles, tenaces y presentan buenos E y $\epsilon_r\%$ (Tabla 2); la inclusión de Qs evitó el uso de plastificante, aspecto positivo en el desarrollo de biomateriales a base de queratina porque sus propiedades relacionadas con la afinidad del agua no se ven afectadas. Tanabe y col., [17] reportaron películas de Qs - K -glicerol con $E = 14\text{MPa}$, $\epsilon_r\% = 24\%$, resultados similares a $P(Qs/K_i)$, confirmando que no es necesario el uso de plastificantes. Si se compara $P(Qs_{(2\%)})$ con $P(Qs/K_i)$, se observó un efecto en la resistencia a la tracción debido a que la red polimérica no está libre debido al entrecruzamiento físico de las cadenas poliméricas generadas por el curado térmico [13; 11].

Tabla 2. Propiedades mecánicas: esfuerzo de tracción (E) y % de elongación ($\epsilon_r\%$) las películas biocompuestas $P(Qs/K_i)$ y control $P(Qs_{(2\%)})$.

Muestra	E (MPa)	$\epsilon_r\%$
$P(Qs_{(2\%)})$	33.8 (4,5) ^b	104.8 (5.3) ^a
$P(Qs/K_i)$	12.9 (0,7) ^a	24.5 (4.6) ^b

Los diferentes superíndices indican diferencias significativas entre los valores de la fila (prueba de comparación LSD de Fisher).

Propiedades térmicas: En la figura 2 se presentan los termogramas obtenidos por TGA y DSC para K_i , $PQs_{(2\%p/p)}$ y $P(Qs/K_i)$.

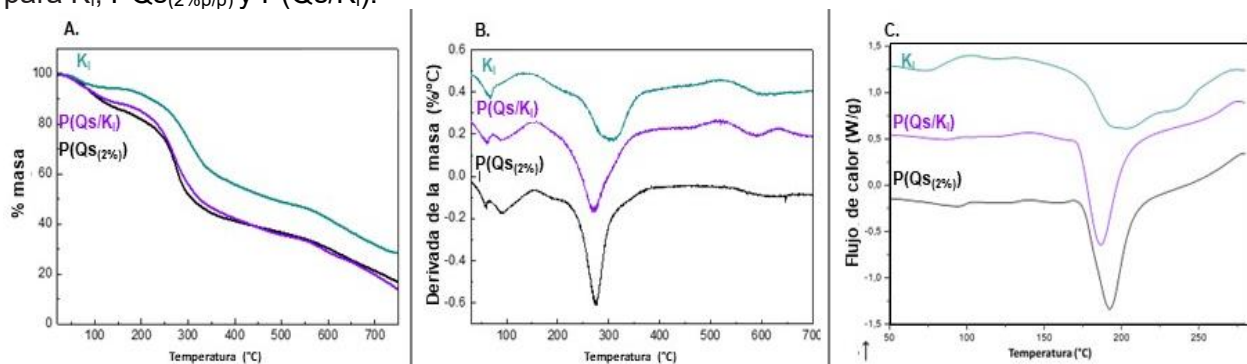


Figura 2. A. Análisis termogravimétrico (TGA); B. 1^{era} derivada (TGA); C. Termogramas (DSC), de la queratina en polvo (K_i), películas $PQs_{(2\%p/p)}$ y $P(Qs/K_i)$.

El análisis termogravimétrico mostró que el agregado de K_i en la matriz condicionó la descomposición térmica. Analizando la primera etapa (20-180°C) correspondiente a la evaporación de agua, la T_{max} de K_i fue 132.6°C significativamente menor a $PQs_{(2\%p/p)}$ (153.1°C) y $P(Qs/K_i)$ (152.0°C) debido a la higroscopicidad del polvo [18]. La segunda etapa (200-400°C) corresponde a la fusión de los biopolímeros con una temperatura más alta para K_i (304.6 °C) [9].

La tercera etapa (500-700°C) a la descomposición de los materiales, para P(Qs/K_i) se observó que esta temperatura no presentó diferencias significativas con la muestra K_i (T_{max}= 579.5 °C) demostrando la funcionalización de esta proteína en el material biocompuesto. El análisis de los termogramas obtenidos por DSC evidenció la alta estabilidad térmica de P(Qs/K_i) (T_p= 191,9 °C), característica de ambos biopolímeros combinados.

Análisis de la microestructura y morfología: La morfología se estudió mediante microscopía electrónica de barrido, las micrografías de la sección transversal de P(Qs/K_i) (Figura 3.a) muestran la matriz compuesta de las dos fases, quitosano lamina lisa como fase continua y las escamas de queratina como material de relleno. Se analizó la estructura de P(Qs/K_i) mediante espectrometría infrarroja FTIR-ATR (Figura 3.b), observando una predominancia de las señales de Qs debido a la relación 70:30 (m:m) empleada en la formulación; se observa la disminución en la Amida I y II debido a la interacción entre los biopolímeros.

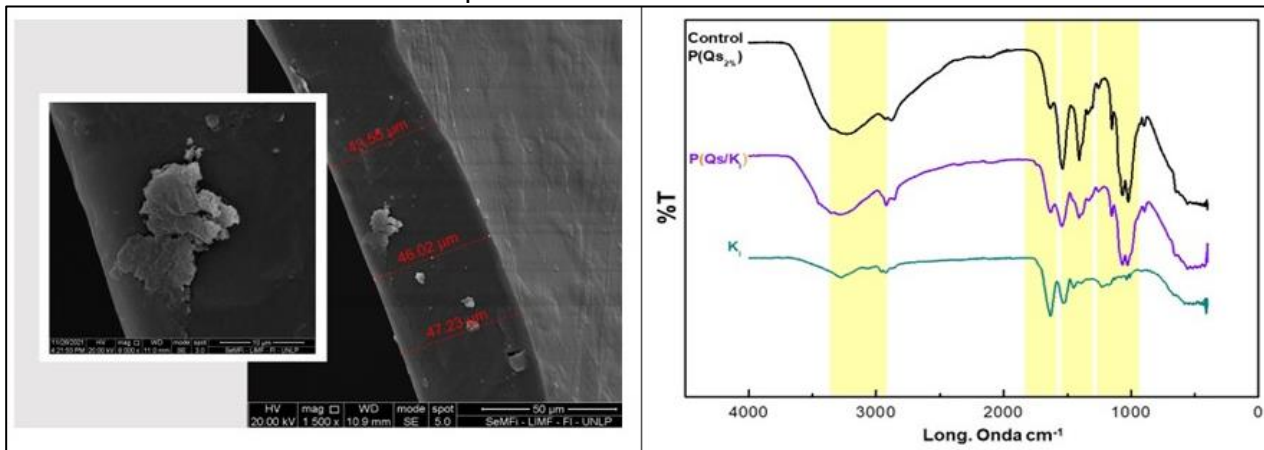


Figura 3.a) micrografías SEM de P(Qs/K_i) (1500x - 4000x. **b)** Espectros ATR-FTIR la queratina en polvo (K_i), películas PQs(2%p/p) y P(Qs/K_i).

Aplicación en el control de *L. monocytogenes* en carne vacuna:

En la primera etapa, como se evidencia en la figura 4.a, la película Qs/K_i presentó actividad antimicrobiana, siendo el porcentaje de inhibición de 30% de la cepa L261. Los recuentos de *L. monocytogenes* presentes en los discos de carne almacenados a 4°C, indicaron que P(Qs/K_i) pueden retardar el crecimiento de la cepa L261, lográndose una reducción de 0.5 ciclos logarítmicos luego de 7 días, presentando un efecto bacteriostático.

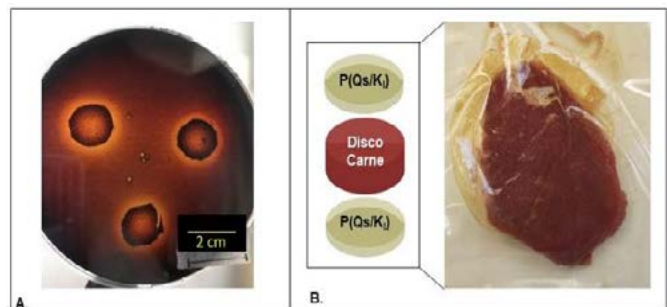


Figura 4. a) Inhibición de *L. monocytogenes* por películas (difusión en disco). **b)** Sistema modelo envasado de carne con P(Qs/K_i).

CONCLUSIONES: Se obtuvieron películas compuestas híbridas biodegradables a partir de la combinación de biopolímeros obtenidos de biomásas de la industria avícola y pesquera, presentando una alternativa para la revalorización de los residuos. La incorporación de queratina en polvo en la formulación desarrollada y la etapa de curado térmico modificaron las diferentes propiedades del biomaterial respecto de las películas control, siendo un material adecuado para aplicaciones de envasado de alimentos y sumado a la actividad antimicrobiana en el control del desarrollo de *L. monocytogenes* es de interés su uso como separadores cárnicos.

REFERENCIAS

- [1] ASTM (1995) Standard test method for water vapor transmission of materials E96-95
- [2] Dou Y, Zhang B, He M, et al (2014) Preparation and Physicochemical Properties of Dialdehyde Starch Crosslinked Feather Keratin/PVA Composite Films. *J Macromol Sci Part A* 51:1009–1015.
- [3] Giménez, B., Graiver, N., Giannuzzi, L., & Zaritzky, N. (2021). Treatment of beef with gaseous ozone: Physicochemical aspects and antimicrobial effects on heterotrophic microflora and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 121, 107602.
- [4] Hernández-Muñoz P, Villalobos R, Chiralt A (2004) Effect of cross-linking using aldehydes on properties of glutenin-rich films. *Food Hydrocoll* 18:403–411.
- [5] Kim, Y. H., Kim, H. J., Yoon, K. S., & Rhim, J. W. (2023). Cellulose nanofiber/deacetylated quaternary chitosan composite packaging film for growth inhibition of *Listeria monocytogenes* in raw salmon. *Food Packaging and Shelf Life*, 35, 101040.
- [6] Kulkarni S (2015) Some Special Nanomaterials. In: *Nanotechnology: Principles and Practices*. Springer Cham, Switzerland, pp 273–315
- [7] Liu S, Huang K, Yu H, Wu F (2018) Bioplastic based on 1,8-octanediol-plasticized feather keratin: A material for food packaging and biomedical applications. *J Appl Polym Sci* 135:1–8.
- [8] Mármol, Z., Fernández, A., Páez, G., Rincón, M., Araujo, K., Aiello, C.(2012). Efecto de la quitina sobre variables relacionadas con la estabilidad en vino blanco. *Fac. Agron.* 29:624-644
- [9] Orjuela-Palacio, J. M., & Zaritzky, N. E. (2021). Evaluación de las condiciones del proceso de extracción de queratina mediante hidrólisis alcalina con hidróxido de sodio. In VI (ITEE).
- [10] Ozer, N. P., & Demirci, A. (2006). Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* inoculated on raw salmon fillets by pulsed UV-light treatment. *International journal of food science & technology*, 41(4), 354-360.
- [11] Perez-Calderon J, Marin-Silva DA, Zaritzky N, Pinotti A (2023) Eco-friendly PVA-chitosan adsorbent films for the removal of azo dye Acid Orange 7: Physical cross-linking, adsorption process, and reuse of the material. *Adv Ind Eng Polym Res*.
- [12] Ramakrishnan N, Sharma S, Gupta A, Alashwal BY (2018) Keratin based bioplastic film from chicken feathers and its characterization. *Int J Biol Macromol* 111:352–358.
- [13] Ramírez DOS, Carletto RA, Tonetti C, et al (2017) Wool keratin film plasticized by citric acid for food packaging. *Food Packag Shelf Life* 12:100–106.
- [14] Rivero S, García MA, Pinotti A (2012) Heat Treatment To Modify the Structural and Physical Properties of Chitosan-Based Films. *J Agric Food Chem* 60:492–499.
- [15] Shavandi, A., Silva, T. H., Bekhit, A. A., y Bekhit, A. E.-D. A. (2017). Keratin: dissolution, extraction and biomedical application. *Biomaterials Science*, 5(9), 1699–1735.
- [16] Song NB, Jo WS, Song HY, et al (2013) Effects of plasticizers and nano-clay content on the physical properties of chicken feather protein composite films. *Food Hydrocoll* 31:340–345.
- [17] Tanabe T, Okitsu N, Tachibana A, Yamauchi K (2002) Preparation and characterization of keratin-chitosan composite film. *Biomaterials* 23:817–825.
- [18] Ullah A, Vasanthan T, Bressler D, et al (2011) Bioplastics from feather quill. *Biomacromolecules* 12:3826–3832.