

NATALIA URRACA ROCHA

**SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS DEGRADADORES
DE PENA ISOLADOS DO SOLO PARA A OBTENÇÃO DE
QUERATINA E FABRICAÇÃO DE FIBRAS TÊXTEIS**



**Trabalho de Conclusão de Curso
apresentada ao Instituto de Microbiologia
Paulo de Góes, da Universidade Federal
do Rio de Janeiro, como pré-requisito
para a obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas: Microbiologia e
Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
MARÇO / 2022**

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Geral, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Ana Maria Mazotto de Almeida.

FICHA CATALOGRÁFICA

O tamanho da ficha possui o seguinte padrão: 7,5cm (altura) X 12,5 cm (largura).

R081s Rocha, Natalia Urraca
Seleção de microrganismos degradadores de pena
isolados do solo para a obtenção de queratina e
fabricação de fibras têxteis / Natalia Urraca Rocha.
-- Rio de Janeiro, 2022.
57 f.

Orientadora: Ana Maria Mazotto de Almeida.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2022.

1. Microrganismos queratinolíticos. 2.
Queratinases. 3. Indústria têxtil. 4. Resíduos da
Indústria avícola: penas. 5. Fibras de queratina. I.
de Almeida, Ana Maria Mazotto , orient. II. Título.

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO
RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO
EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA**

ALUNO: Natalia Urraca Rocha

DRE: 118092591

BANCA EXAMINADORA: Profa. Gabriella da Silva Mendes (Presidente)
Profa. Dirlei Nico
Prof. Mateus Gomes de Godoy
Profa. Carolina Neumann Keim (Suplente)

**Título da Monografia: “Seleção de microrganismo degradador de pena
isolado do solo para a obtenção de queratina e fabricação de fibras
têxteis”**


Local: Sala virtual <https://meet.google.com/dqv-fjdd-nwc>

Data e hora de início: 10 de março de 2022 às 09:00h

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota **10,0** neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelo presidente da banca examinadora, aluno, orientador (ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 10 de março de 2022.

NOTA	Banca Examinadora:
10,0	Profa. Gabriella da Silva Mendes
10,0	Profa. Dirlei Nico
10,0	Prof. Mateus Gomes de Godoy
	Profa. Carolina Neumann Keim

Presidente da banca 
Profa. Gabriella da Silva Mendes

Aluno: 
Natalia Urraca Rocha

Orientador: 
Profa. Ana Maria Mazotto de Almeida

Coordenador
de TCC 
Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, eu gostaria de agradecer a minha orientadora Ana Maria Mazotto de Almeida por ter aceitado me orientar e por ter me incluído nesse projeto. Suas ideias, seu conhecimento e seu apoio foram fundamentais para a realização e o avanço deste trabalho, especialmente em meio a Pandemia de Covid-19. Em segundo, eu agradeço à Larissa Brito, que também participou deste projeto, por sua dedicação e empenho. Por último, quero agradecer a Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), ao Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial (SENAI), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e ao Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (Sebrae) pelas parcerias e pela colaboração.

RESUMO

NATALIA URRACA ROCHA

SELEÇÃO DE MICRORGANISMO DEGRADADOR DE PENA ISOLADO DO SOLO PARA A OBTENÇÃO DE QUERATINA E FABRICAÇÃO DE FIBRAS TÊXTEIS

Orientadora: Ana Maria Mazotto de Almeida

Resumo do Trabalho de Conclusão de Curso apresentado no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

A indústria têxtil vem adquirindo nos últimos anos uma grande importância na economia mundial. No entanto, o grande desenvolvimento econômico proporcionado por esse setor é seguido de diversos impactos ambientais. Um dos fatores que gera esses problemas é a escolha da matéria-prima que irá compor as fibras têxteis. O algodão e poliéster são os materiais mais utilizados, e ambos causam impactos ambientais, como alto consumo de químicos, água e energia e emissão massiva de gases estufa. Em paralelo, a indústria avícola também desempenha um papel de destaque na economia brasileira, porém esse ramo também é responsável pelo descarte de vários resíduos, principalmente penas. Estas últimas são 90% compostas de queratina, uma proteína estrutural fibrosa, rica em pontes de dissulfeto e de hidrogênio, o que confere a essa molécula uma grande estabilidade mecânica e rigidez. Além disso, a estrutura dessa proteína permite que ela seja usada em determinados processos de fiação para a fabricação de fibras têxteis. Por outro lado, a extração da queratina das penas costuma ocorrer por meio de tratamentos químicos, cujos produtos aplicados tendem a ser pouco ecológicos, caros ou dão origem a proteínas muito pequenas. Uma possível solução é o biotratamento da queratina com microrganismos queratinolíticos. Desta forma, este trabalho objetivou isolar microrganismos queratinolíticos do solo contendo penas e selecionar aquele que tem maior eficiência na degradação de penas. Foram isoladas 22 bactérias, das quais 9

apresentaram atividade proteolítica em meio ágar caseína de leite e atividade queratinolítica, detectada por meio da degradação de penas em cultivo líquido. Das cepas isoladas, a que apresentou maior potencial para o biotratamento de penas foi a cepa MR11, que chegou a produzir 5,89 mg/mL de proteínas em seu sobrenadante. Esta cepa foi parcialmente identificada como um provável *Bacillus* sp por MALDI-TOF. No entanto, os resultados aqui apresentados são preliminares e, futuramente, devem ser realizadas análises complementares para determinação da massa das proteínas liberadas durante a hidrólise de penas pelos microrganismos isolados. Esses testes visarão averiguar com maior segurança se MR 11 é o microrganismo ideal para ser utilizado na obtenção de queratina das penas e, posteriormente, na fiação dessa proteína.

Palavras-chave: fibras, penas, queratina, queratinases e microrganismos queratinolíticos

ABSTRACT

NATALIA URRACA ROCHA

SELECTION OF FEATHER DEGRADING MICROORGANISMS ISOLATED FROM SOIL FOR THE OBTAINING OF KERATIN AND MANUFACTURE OF TEXTILE FIBERS

Supervisor: Ana Maria Mazotto de Almeida

Abstract do Trabalho de Conclusão de Curso apresentado no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

The textile industry has acquired great importance in the world economy in recent years. However, the economic development provided by this sector is followed by several environmental impacts. One of the factors that generates these problems is the choice of raw material that will compose the textile fibers. Cotton and polyester are the most used materials, and both cause environmental impacts, such as high consumption of chemicals, water and energy, and massive emission of greenhouse gases. In parallel, the poultry industry has also a prominent role in the Brazilian economy, but this branch is also responsible for the disposal of various wastes, especially feathers. These ones are 90% composed of keratin, a fibrous structural protein, rich in disulfide and hydrogen bonds, which gives this molecule great mechanical stability and rigidity. Furthermore, the structure of this protein allows it to be used in certain spinning processes for the manufacture of textile fibers. On the other hand, the extraction of keratin from feathers usually occurs through chemical treatments, whose applied products tend to be less ecological, expensive or give rise to very small proteins. A possible solution is the biotreatment of keratin with keratinolytic microorganisms. Thus, this work aims to isolate microorganisms from soil containing feathers and select the one that has the greatest efficiency in feather degradation. Twenty-two bacteria were isolated, of which 9 showed proteolytic activity on milk casein agar and keratinolytic activity, detected through the degradation of feathers in liquid culture. Of the strains isolated, the one that showed the

greatest potential for the biotreatment of feathers was the MR11 strain, which produced 5.89 mg/mL of proteins in its supernatant. This strain was partially identified as probable *Bacillus* sp. by MALDI-TOF. However, the results presented here are preliminary and, in the future, additional analyzes should be performed to determine the mass of proteins released during the hydrolysis of feathers by the isolated microorganisms. These tests will aim to determine with greater certainty whether MR 11 is the ideal microorganism to be used to obtain keratin from feathers and, later, in the spinning of this protein.

Keywords: fibers, feathers, keratin, keratinases and keratinolytic microorganisms

RESUMO PARA LEIGOS

NATALIA URRACA ROCHA

SELEÇÃO DE MICRORGANISMO DEGRADADOR DE PENNA ISOLADO DO SOLO PARA A OBTENÇÃO DE QUERATINA E FABRICAÇÃO DE FIBRAS TÊXTEIS

Orientadora: Ana Maria Mazotto de Almeida

Resumo para leigos do Trabalho de Conclusão de Curso apresentado no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Atualmente, indústria têxtil possui um enorme destaque econômico, contudo esse ramo também causa muitos danos ao meio ambiente. Uma das fontes desses problemas ambientais é o material utilizado na confecção de fibras têxteis. As matérias-primas mais disponíveis no mercado têxtil são o algodão e poliéster e sua fabricação costuma envolver o consumo de uma enorme quantidade de água e energia, gera uma grande emissão de gases estufa e precisa de muitos produtos químicos, que são tóxicos para os seres vivos e o meio ambiente. Em paralelo, a indústria avícola desempenha um papel importante na economia brasileira, mas também despeja uma enorme quantidade de resíduos avícolas, principalmente penas. 90% da pena é constituída de queratina, uma proteína que apresenta uma estrutura molecular que permite que essa molécula tenha muita rigidez e estabilidade mecânica. Além disso, essa estrutura e o tamanho da queratina também são adequados para a sua fiação em fibras têxteis. Por outro lado, os métodos que tendem a ser aplicados para a extração da queratina das penas envolvem tratamentos com substâncias químicas que, na maioria das vezes, são caras, pouco ecológicas ou resultam em proteínas pequenas demais para serem fiadas. Uma possível solução é o uso de microrganismos produtores de queratinases, proteínas específicas para a degradação de queratina e dos materiais constituídos dela, o que tornaria a confecção de fibras de queratina um processo mais ecológico. Portanto, o objetivo desse trabalho é encontrar e isolar esses microrganismos do ambiente e escolher aquele que seja mais eficiente na degradação das penas e extraia mais queratina para que futuramente, esta consiga ser fiada.

ÍNDICE

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
RESUMO PARA LEIGOS.....	x
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Impactos ambientais da indústria têxtil	1
1.2 A indústria avícola e gestão de seus resíduos de penas.....	4
1.3 Estrutura das queratinas.....	6
1.4 Uso de penas na fabricação de fibras.....	9
1.5. Queratinases e microrganismos queratinolíticos.....	12
2 JUSTIFICATIVA	18
3 OBJETIVOS	19
4 MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 Obtenção e processamento das penas de frango.....	20
4.2 Isolamento de microrganismos queratinolíticos de amostras de solo.....	20
4.3 Espectrometria de massas (MALDI- TOF) dos microrganismos isolados.....	20
4.4 Seleção dos microrganismos degradadores de proteínas.....	21
4.5 Determinação dos microrganismos queratinolíticos	21
4.6 Seleção do microrganismo que obteve mais sucesso na hidrólise de penas.....	22
4.7 Quantificação de proteínas.....	23
5 RESULTADOS	25
5.1 Isolamento de microrganismos queratinolíticos de amostras de solo.....	25
5.2 Identificação parcial por espectrometria de massas (MALDI- TOF) dos microrganismos isolados.....	25

5.3 Seleção dos microrganismos degradadores de proteínas.....	27
5.4 Determinação dos microrganismos queratinolíticos.....	28
5.5 Quantificação de proteínas presentes no sobrenadante do teste de seleção do microrganismo queratinolíticos.....	29
5.6 Seleção dos microrganismos através da degradação de penas.....	31
5.7 Seleção dos melhores microrganismos degradadores de penas através da concentração de proteínas presentes no sobrenadante de cultura.....	32
6 DISCUSSÃO	34
7 CONCLUSÕES	39
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1 INTRODUÇÃO

1.1 Impactos ambientais da indústria têxtil

Atualmente, o mercado têxtil é um dos setores mais relevantes dentro da economia mundial e o valor da indústria têxtil global é de US\$ 3 trilhões (Da Motta, 2021). Segundo a revista Forbes, apenas a cadeia de valor da indústria de roupas movimenta US\$ 1,3 trilhão e produz 300 milhões de empregos (Durocher, 2020). Nesse ramo, o Brasil está posicionado como o quinto maior produtor têxtil do mundo e apresenta o quarto maior parque de confecção (Schmitt e Folle, 2020). De acordo com a Associação Brasileira da Indústria Têxtil e de Confecção (ABIT), esse setor gera no país, aproximadamente, 1,36 milhão de empregos diretos e 8 milhões de empregos indiretos, o que torna essa indústria a segunda que mais emprega dentro da indústria da transformação, perdendo apenas para o ramo de bebidas e alimentos juntos (ABIT, 2022a). Em 2021, a indústria têxtil e de confecção brasileira obteve um faturamento de R\$ 194 bilhões, o que indica um aumento de 20% em comparação com 2020. Além disso, no mesmo ano, a produção de produtos têxteis e das confecções cresceram 12,1% e 15,1% ante 2020. As previsões apontam que um crescimento de 1,2% do setor têxtil brasileiro em 2022 em relação a 2021 (ABIT, 2022b).

Por outro lado, a indústria têxtil também é responsável por diversos impactos ambientais (Muthu, 2017). As complicações originadas dessa atividade estão relacionadas, principalmente ao imenso consumo de água, combustíveis, produtos químicos, à grande poluição do ar e despejo de resíduos sólidos e efluentes (Barros 2021). Na fabricação 1 kg tecido, são necessários entre 100 e 150 litros de água e entre 1,5 kg e 6,9 kg de substâncias químicas o que indica que a quantidade de recursos que são consumidos nesse processo é muito superior à quantidade de produto final (Roos, 2016; The Sustainable Business Group, 2015). No caso da água, a dependência hídrica e seus efeitos são maiores nas fases de cultivo de algodão e de tingimento, acabamento, tratamento e de lavagem do tecido. A poluição causada durante esses processos pode levar à eutrofização e reduzir as fontes de água potável para as pessoas, além de prejudicar a vida aquática (The Sustainable Business Group, 2015). Na situação dos combustíveis e da poluição do ar, há uma grande emissão de dióxido de carbono (CO₂) e enxofre originado das cadeiras utilizadas no setor têxtil e estima-se que anualmente, 1,2 bilhão de toneladas desses gases são gerados. Estes podem levar a produção de chuvas ácidas, à diminuição da qualidade do ar e ao desenvolvimento de problemas respiratórios, especialmente em crianças e idosos (De Rossi, 2019). No caso dos produtos químicos, estes são aplicados, principalmente no cultivo de algodão, no alvejamento, na

tinturaria e na estampagem (Berlin, 2014) e acredita-se que são usadas mais de 8000 substâncias químicas na indústria têxtil. Esses compostos podem causar danos ao meio ambiente e à saúde humana, já que muitas pessoas que trabalham na fabricação, na reciclagem e no descarte deles ficam expostas aos malefícios desses elementos. Um dos motivos para isso é o grande despejo de produtos químicos nos efluentes dos locais de processamento têxtil, que permite que essas substâncias entrem em contato com humanos e animais e que levem ao aparecimento de cânceres ou distúrbios no sistema hormonal destes. Alguns desses compostos, como alquilfenóis e substâncias per e polifluoroalquil (PFAS), não podem sequer serem retirados durante o tratamento de águas residuais (SAICM, 2021).

Diante desse cenário, há a necessidade de desenvolvimento de novos materiais e processos que reduzam a degradação ambiental. Uma das opções é buscar por matérias primas alternativas que produzam tecidos naturais e sustentáveis que supram as demandas e exigências do consumidor, mas que também gerem menos danos à natureza (Provin, Cubas e Dutra, 2020). Atualmente, existem 3 tipos de fibras disponíveis no mercado: as fibras sintéticas, as fibras naturais e fibras artificiais. As fibras sintéticas são aquelas originadas de polímeros derivados do petróleo. As fibras naturais são aquelas que apresentam origem animal ou vegetal (Aguilera e Colerato, 2021). As fibras artificiais são aquelas desenvolvidas a partir da celulose e, também tratadas quimicamente (Barros, 2021). Dentro dessa diversidade de fibras, as que lideram o mercado são as fibras sintéticas e as fibras naturais, visto que o poliéster e o algodão correspondem a 51% e a 25% da produção mundial de fibras têxteis (Zanon, 2021).

As fibras naturais mais utilizadas na confecção de tecidos são algodão, algodão orgânico, lã, bambu, linho e cânhamo (Roos, 2016; Muthu, 2017). A fibra mais usada desse grupo é a de algodão, que representa 80% da produção de fibras naturais (CropLife Brasil, 2020). A fabricação de tecidos com esse material requer um enorme consumo de água, principalmente durante o cultivo, e de energia e emite muitos gases estufa (Aguilera e Colerato, 2021). Acredita-se que a elaboração de uma camiseta de algodão causa a liberação de 2,1 kg de CO₂ (dióxido de carbono) (Nature Climate Change, 2018) e em relação a energia, uma peça de algodão pode precisar de 350 e 724,7 MJ/kg de fibra, do início de sua confecção até o momento de descarte e decomposição (Aguilera e Colerato, 2021). Ademais, estima-se que a produção de 1 kg de fibras de algodão necessita em média 10.000 litros de água e o sistema de irrigação que costuma ser usado é o de irrigação por sulcos, que é pouco eficaz (O Globo, 2021). Nesse sistema, são formados sulcos com água entre as linhas de plantio que são

responsáveis por promover a infiltração da água de maneira horizontal e vertical para que o solo fique úmido e a planta consiga se desenvolver. No entanto, esse método tem como problema o escoamento de água no final do sulco o que faz com que parte desta seja perdida. Apenas de 30% a 80% da superfície do solo consegue ser umedecida, já que esse número pode variar de acordo com a cultura e o espaçamento entre os sulcos (SENAR, 2019). Outro fato que piora essa situação é o que as plantações de algodão ocupam 2,5% de todas as terras usadas para cultivo no mundo, porém consomem 11% dos produtos agrícolas e 25% dos inseticidas aplicados globalmente (Roos, 2016). Apesar dos pesticidas e inseticidas contribuírem para melhorar a qualidade do produto e diminuir as perdas causadas pelas pragas, esses agrotóxicos alteram a microbiota do solo, o que afeta a absorção de nutrientes pelas plantas e a fertilidade da terra (Berlin, 2014). Essas substâncias químicas também podem poluir lençóis freáticos, causar problemas de saúde em trabalhadores e reduzir a biodiversidade dos ecossistemas naturais. Outro malefício é que muitos fertilizantes despejados em plantações de algodão possuem imensas quantidades de nitrato o que pode levar a produção de óxido nitroso (N_2O), um gás estufa com um potencial destruidor 300 vezes maior que o CO_2 (Berlin, 2014; Muthu, 2017).

As fibras sintéticas mais usadas na produção têxtil são o náilon, poliéster, acrílico, látex e cloreto de polivinila (PVC) (Muthu 2017). Elas são termoplásticas, plásticos maleáveis em temperaturas elevadas, e desenvolvidas a partir de fontes não renováveis, especialmente petróleo. Esse processo de fabricação promove a formação de compostos orgânicos voláteis e efluentes, que apresentam antimônio em sua composição. Esta última é uma substância tóxica para o meio ambiente e para o ser humano, uma vez que pode levar à irritação na pele e nos olhos, inflamação nos pulmões e bronquite e causar a contaminação dos lençóis freáticos (De Ecoa, 2021). O fato dessas fibras serem elaboradas com o uso de petróleo também ocasiona uma grande emissão de CO_2 o que contribui para o efeito estufa, além do fato de que essas fontes tornam esse material mais difícil de ser decomposto na natureza. Ademais, essas fibras também precisam de uma quantidade maior de energia em comparação às fibras geradas a partir de fontes renováveis (Berlin, 2014; Tesfaye, Sithole e Ramjugernath, 2018).

Esse quadro se agrava ainda mais com a adoção do modelo “fast fashion”, em que novas linhas de roupas chegam ao mercado em um intervalo muito curto de poucas semanas. Um dos motivos para isso é que as empresas conseguiram reduzir, significativamente, seus custos de produção, o que diminuiu os preços das roupas e fez com que estas se tornassem um bem mais acessível. Essas circunstâncias contribuíram para o aumento do consumo e,

consequentemente, do descarte dessas peças (Nature Climate Change editorial, 2018; Koszewska, 2018). Isso é refletido no fato de que, anualmente, o setor têxtil coloca no mercado 100 milhões de toneladas de novos produtos e 60% das roupas fabricadas são descartadas nesse período (Roos, 2016; Nature Climate Change editorial, 2018) e apenas de 15% a 20% de todos os produtos têxteis são reciclados. Segundo o *Global Fashion Agenda* (Agenda de moda global) e *The Boston Consulting Group*, de 2015 até 2030, os resíduos da indústria da moda crescerão 60%. Atualmente, a superprodução de roupas permite que apenas 30% delas sejam vendidas pelo preço estipulado inicialmente, e as 70% restantes devem se dividir entre as 30% que são destinadas para a liquidação e as 40% que não são vendidas ou nem mesmo chegam às lojas. Com isso, os desperdícios gerados pela indústria da moda podem vir de 3 fontes: resíduos pós-industriais, resíduos pré-consumo e resíduos pós-consumo. Os resíduos pós-industriais são aqueles originados durante a fabricação de roupas. Os resíduos pré-consumo vêm de roupas de pior qualidade ou roupas não vendidas nas lojas. Os resíduos pós-consumo são aqueles gerados por consumidores que descartam roupas indesejadas ou com defeitos (Koszewska, 2018).

Portanto, diante dos danos ambientais que a indústria têxtil ocasiona, houve a mobilização de produtores e varejistas na busca de soluções que amenizem essas questões (Muthu, 2017). Já existem muitas empresas que tomaram medidas em relação a essa situação. Elas anteciparam a existência de futuras legislações ambientais e passaram a promover políticas mais sustentáveis e a utilização de produtos e serviços que tenham menos impacto na natureza, o que é considerado, atualmente, um diferencial competitivo (Berlin, 2014). Desse modo, devem ser adotadas normas preventivas e tecnológicas que possam manter o equilíbrio entre sistema ecológico e a fabricação de produtos mais sustentáveis (Suparna e Antony, 2016). Esse quadro contribuiu para que a indústria têxtil começasse a sua procura por matérias primas naturais alternativas que produzam fibras com características semelhantes às fibras naturais já encontradas no mercado (Tsfaye, Sithole e Ramjugernath, 2018).

1.2 A indústria avícola e gestão de seus resíduos de penas

No Brasil, a avicultura começou como uma atividade mais voltada para a subsistência e apenas os excedentes da criação de aves eram comercializados. Em 1930, aproximadamente, ela passou a ser uma área mais comercial e contou com o desenvolvimento das primeiras iniciativas privadas nesse setor. Na década de 70, a avicultura atingiu um crescimento maior,

visto que houve a entrada de empresas maiores nesse ramo e profissionais especializados na criação de frangos. Em seguida, houve o surgimento de novas tecnologias e técnicas de produção intensiva e de avanços na engenharia genética, o que contribuiu ainda mais para progresso do setor avícola. Segundo o IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), entre 1983 e 2013, houve um aumento significativo do número de aves nos rebanhos, em todas as regiões do Brasil (De Zen *et al.*, 2014). De acordo com os dados divulgados pela *United States Department of Agriculture* (USDA) (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos), o Brasil é, atualmente, o terceiro maior produtor de carne de frango do mundo (AviSite, 2021a). Em 2020, o país apresentou um consumo per capita de 45,27 kg de carne de frango (ABPA, 2020). Segundo as estimativas do Ministério da Agricultura (MAPA), em 2031, o Brasil atingirá uma produção de 34 milhões de toneladas de carne (frango, bovina e suína) em que, aproximadamente 55% disso será de carne de frango (18,7 milhões) (AviSite, 2021b).

As várias toneladas de frango produzidas também acarretam a geração de uma grande quantidade de resíduos sólidos. Estima-se que apenas entre 34% e 52% do peso total da carne dos animais abatidos é destinada para consumo (Garcia *et al.*, 2003) e o demais são resíduos, sendo as penas um dos principais resíduos vindos do abate dos frangos (Safaric *et al.*, 2020), constituindo entre 5% e 7% do peso do frango (Duffeck, 2020). A indústria avícola gera entre 8 e 9 milhões de toneladas de penas por ano (Safaric *et al.*, 2020) e a maioria delas é destinada a aterros sanitários ou é queimada em usinas de incineração ou é reutilizada em rações de animais. Cerca de 90% da pena é constituída por queratina, uma proteína estrutural fibrosa, rica em aminoácidos, como cisteína, lisina, prolina e serina, que se organizam por meio da formação de pontes de dissulfeto e de hidrogênio. Dessa forma, a presença de enxofre na queratina das penas permite que, quando estas são despejadas no meio ambiente haja a formação de dióxido de enxofre e este polua o solo e o ar, se as penas forem queimadas. Com isso, o descarte de penas se tornou um problema ambiental (Prasanthi, Bhargavi e Machiraju, 2016) e é importante para a gestão de resíduos industriais encontrar uma forma eficiente de reutilizá-las.

As penas são um dos subprodutos agrícolas mais baratos que existem e podem ser usadas em aplicações de maior valor agregado, uma vez que apresentam características como baixa densidade, alta flexibilidade, alta compressibilidade, alta capacidade de retenção de calor e isolamento acústico e estrutura proteica (Safaric *et al.*, 2020). Esta última propriedade permite que as penas sejam utilizadas como suplemento proteico na ração animal na forma de

farinha de penas. Isso é feito por meio de cozimento das penas a alta pressão, o que altera as ligações dissulfeto e polipeptídicas e faz com que estas fiquem mais digeríveis (Tiquia *et al.*, 2005). No entanto, apenas uma pequena parcela dos resíduos de pena da indústria agrícola é destinada a fabricação desses produtos (Safaric *et al.*, 2020). A compostagem das penas pode fazer com que estas também sirvam como fertilizante, devido ao seu alto teor de nitrogênio (Tiquia *et al.*, 2005). Além disso, há projetos que estudam o potencial de reciclagem desse resíduo, como seu uso na absorção de metais pesados, na produção de carbono catalítico, de papel, de materiais que misturam as penas com polímeros sintéticos, no desenvolvimento de materiais de construção que precisem de isolamento térmico ou acústico, entre outros (Safaric *et al.*, 2020).

1.3 Estrutura das queratinas

A queratina é uma proteína insolúvel (Mazotto *et al.*, 2013) que apresenta aminoácidos que formam cadeias muito enoveladas em que ocorrem interações por pontes dissulfeto intramoleculares e intermoleculares e ligações iônicas, de hidrogênio e hidrofóbicas (Pulidori *et al.*, 2021). Dois aminoácidos destacam-se na composição da queratina: a cisteína e a glicina. O teor de cisteína varia entre 7-13% na molécula de queratina e é responsável pela formação das pontes dissulfeto, já o teor de glicina pode chegar a concentrações maiores que 28% em queratinas mais duras como as de garras, bicos e casco de tartaruga. A glicina contribui para a hidrofobicidade, dureza e resistência a degradação das queratinas (Perta-Crisan *et al.*, 2021).

A queratina pode ser classificada de acordo com sua estrutura em α - queratina e β - queratina. A α - queratina (figura 1) costuma estar localizada na epiderme de animais, especialmente mamíferos, e faz parte da composição do cabelo, unhas e pelos (Chilakamarry *et al.*, 2021) A α -queratina é encontrada em dímeros formados pelo enovelamento de duas α -hélices, uma hélice tipo 1 (ácida) e uma hélice tipo 2 (básica/neutra), estabilizadas por pontes dissulfeto e ligações de hidrogênio (Qiu *et al.*, 2020).

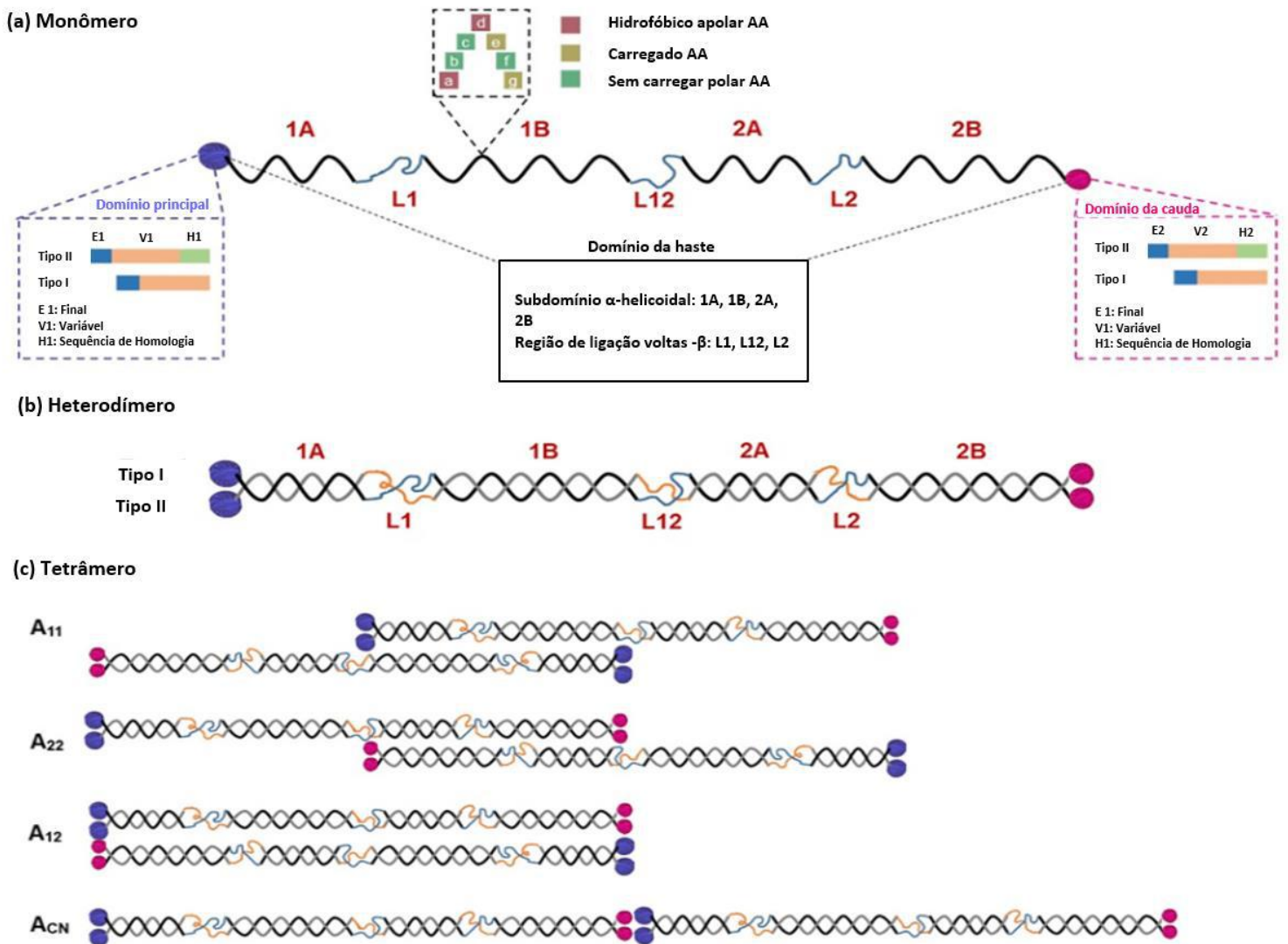


Figura 1 - Estrutura secundária de α -queratina. (a) Estrutura do monômero composta de três partes: domínio da cabeça (domínio N-terminal), domínio da haste (domínio α -helicoidal) e domínio da cauda (domínio C-terminal). Além disso, o padrão de sete aminoácidos repetidos na α -hélice está destacado na parte superior da figura; (b) Estrutura heterodimérica formada a partir de dois monômeros (um monômero de queratina tipo I e um monômero de queratina tipo II) em alinhamento paralelo; (c) Dois heterodímeros montados em um tetrâmero de quatro maneiras diferentes: A11, A22, A12, ACN. Os tetrâmeros são utilizados como unidades de montagem dos filamentos de α -queratina. 1A, 1B, 2A e 2B representam domínios em α -hélice, enquanto L1, L12 e L2 representam regiões amorfas de ligação. (Retirado de Qiu et al. 2009)

Já, a β - queratina (figura 2) é encontrada apenas em aves e répteis em escamas, bicos, garras, cascos e penas (Chilakamarry *et al.*, 2021). A formação da β - queratina se dá pelo dobramento da cadeia polipeptídica formando 4 fitas paralelas mantidas pelas pontes de hidrogênio dos grupos C=O e N-H entre duas ou mais cadeias polipeptídicas adjacentes (Mauricio, 2019). Para a geração do filamento de β - queratina, duas folhas se ligam para

formar um dímero que é distorcido de forma helicoidal e sobreposto a outros dímeros, o que leva à constituição de um filamento com diâmetro de 4 nm. As partes terminais das cadeias peptídicas envolvem os filamentos, formando a matriz (Perta-Crisan *et al.*, 2021).

As queratinas das penas apresentam tanto uma estrutura em α -hélice (32,2%), como estruturas em folha β -pregueada (53,6%) e regiões amorfas (14,2%). A proporção destas conformações ao longo das partes da pena (raque, barba ou bárbulas) varia. Entanto a estrutura em β -pregueada é plana e rígida, a α -hélice confere elasticidade e isso justifica por que a raque (parte central e mais rica em folha β -pregueada) é mais rígida e difícil de degradar que as barbas e bárbulas (Qiu *et al.*, 2020).

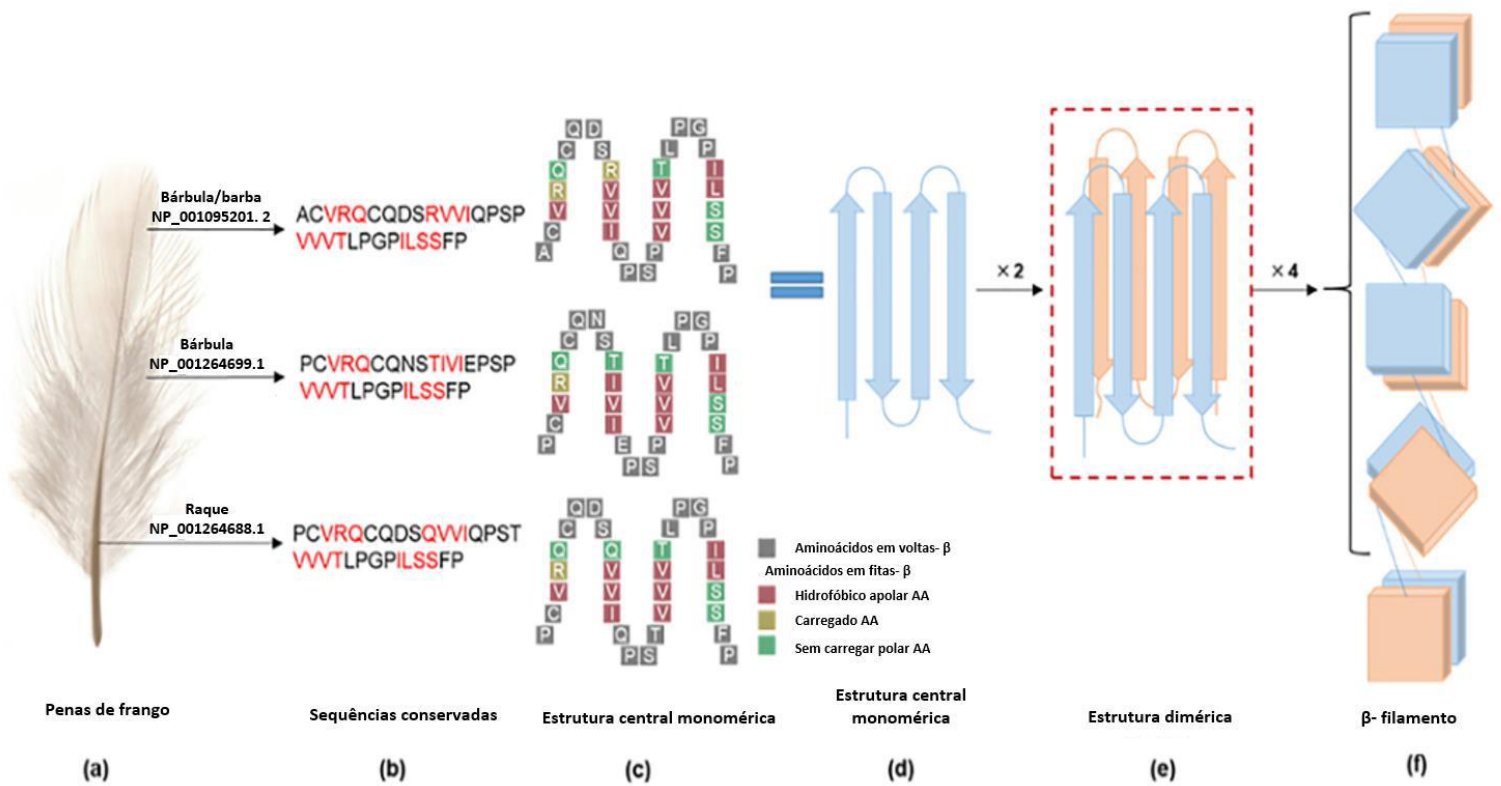


Figura 2 - Estrutura da pena e estrutura secundária da β -queratina. (a) A estrutura das penas apontando suas partes principais: bárbulas/farpas, barbas, raque; (b) Aminoácidos conservados das bárbulas/farpas (número de acesso NCBI: NP_001095201.2), barbas (NP_001264699.1) e raque de penas (NP_001264688.1) com as fitas β em cada sequência indicada em vermelho; (c) A estrutura central monomérica da β -queratina nas penas baseada na composição de aminoácidos. (d) A estrutura monomérica central da β -queratina, onde as quatro fitas são usualmente antiparalelas; (e) Estrutura dimérica (β -sanduíche) de β -queratina; (f) A estrutura básica de repetição dos filamentos β , com os quatro dímeros girados em aprox. 45° para formar uma estrutura helicoidal, com o quinto dímero na parte inferior assumindo uma posição sanduíche invertida em relação ao primeiro dímero (Retirado de Qiu *et al.*, 2020).

A estrutura das queratinas confere a essa proteína uma grande resistência à tração, estabilidade mecânica, rigidez e resistência a tratamentos químicos, enzimáticos e térmicos. Nesse sentido, o uso dessa proteína em larga escala deve contar com procedimentos de extração que sejam adequados, rápidos e econômicos. Atualmente, os métodos químicos que rompem as ligações dissulfeto da queratina são os mais utilizados para a extração da mesma (Pulidori *et al.*, 2021). Agentes redutores podem quebrar as ligações dissulfeto, ligações de hidrogênio e ligações salinas da queratina e torná-la solúvel (Gupta *et al.*, 2012), como β -mercaptoetanol (tiol) e metabissulfito de sódio, no entanto, estes são extremamente tóxicos (Pulidori *et al.*, 2021). Ademias, os tióis, quando usados em larga escala, são muito caros e não são ecológicos (Xu, 2013). A extração de queratina também ocorre por meio de soluções alcalinas (Pulidori *et al.*, 2021), mas esse método ocasiona a quebra aleatória das pontes de dissulfeto e das cadeias principais da queratina o que pode gerar moléculas muito pequenas para serem fiadas (Xu, 2013). Além disso, frequentemente, os agentes químicos não são recicláveis, originam uma grande quantidade de resíduos tóxicos e precisam de muita energia para realizarem suas atividades. Sendo assim, esses fatores contribuem para que os métodos enzimáticos de hidrólise de proteínas sejam mais explorados, atualmente (Matos *et al.*, 2021).

1.4 Uso de penas na fabricação de fibras

Como já foi visto anteriormente, o processo de produção da grande maioria das fibras naturais ou sintéticas utilizadas no mercado atual gera vários impactos ambientais negativos. Desse modo, outras fontes de fibras estão sendo estudadas para a redução da gravidade desses problemas. Uma das maneiras de fabricação de fibras que está sendo desenvolvida é por meio do uso de subprodutos da produção de alimentos. Atualmente, existem pesquisas que aproveitam por exemplo, folhas de abacaxi, cascas de milho, cascas de arroz, entre outros para a obtenção de fibras de celulose. As mesmas tentativas já foram feitas na criação de fibras proteicas, porém elas não tiveram muito êxito no mundo comercial. Nesse sentido, o uso de penas como fonte para a elaboração de fibras naturais se tornou uma possibilidade, pois as penas são um resíduo barato e são compostas, majoritariamente, por queratina (Tesfaye, Sithole e Ramjugernath, 2018).

A queratina é uma das proteínas que recobre o corpo de aves, reptéis e mamíferos e é ser encontrada na pele e seus anexos como cabelo, lã, unhas, cascos, garras, escamas, chifre, bico e penas. No entanto, os resíduos mais abundantes que possuem queratina são as penas, o

que contribui para que elas sejam utilizadas na extração de queratina para sua aplicação na indústria (Sharma e Gupta, 2016). Essa proteína pode ser reaproveitada na elaboração de biomateriais como hidrogéis, biofilmes, esferas, micro e nano partículas, que podem ser empregados na indústria cosmética, médica, têxtil e de outros materiais (Matos *et al.*, 2021). No caso de produção de fibras têxteis, a queratina atende aos critérios para ser fiada, pois ela é uma pequena proteína com grupos laterais volumosos e peso molecular compatível (10 KDa). Além disso, as cisteínas da queratina podem ajudar na formação de fibras estáveis em água. Desse modo, a fabricação de fibras de queratina pode ser uma alternativa para a redução dos danos gerados pela indústria de fibras na natureza. Atualmente, já há trabalhos que já estudam a criação dessas fibras e as diferentes maneiras de usá-las.

Em 2013, na dissertação de Helan Xu, “Regenerated keratin fibers from chicken feathers for textile and biomedical applications”, foram criadas fibras de queratina por eletrofição. Nesse trabalho, a queratina das penas de frango foi extraída por meio da imersão destas em ureia, que desestabiliza as ligações de hidrogênio inter e intramoleculares e enfraquece a interação hidrofóbica entre os polipeptídeos, o que expõe as cadeias polipeptídicas da queratina. Isso permitiu que a cisteína, usada como um agente redutor no experimento, rompa as ligações dissulfeto da queratina. Após esse processo e a quebra das pontes de dissulfeto, a queratina foi precipitada, lavada e pulverizada. A proteína extraída foi misturada com SDS e tampão carbonato-bicarbonato de sódio e em seguida a solução foi aquecida. Esse tratamento fez a queratina adquirir uma estrutura mais linear e com sua cadeia principal preservada, fatores necessários para a fiação. Ademais, essa mistura carregada negativamente foi colocada na seringa do eletrofiador com placa de coleta carregada positivamente. À medida que a gota da solução que está na seringa saía, ela era atraída para a placa de coleta e gerava uma fibra (Xu, 2013) (Figura 3).

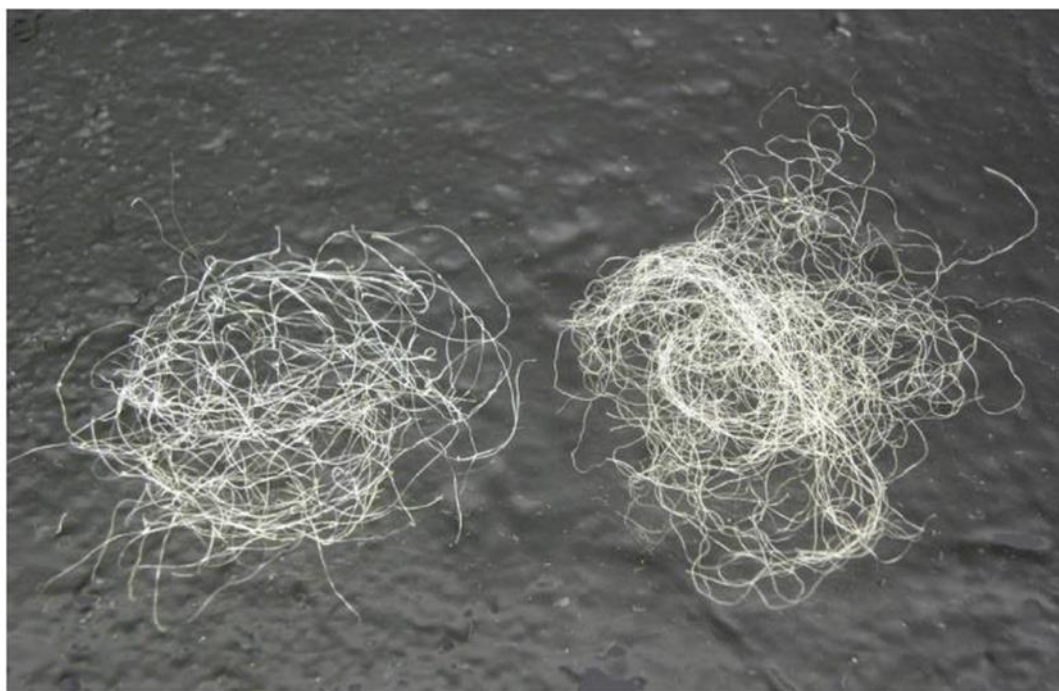


Figura 3 - Fotografia das fibras de queratinas regeneradas produzidas por Xu (2013) a esquerda e a direita lã natural (Imagem retirada de Xu, 2013)

Um outro estudo em que também consta a formação de nanofibras com queratina é o descrito por Ming He, Buning Zhang, Yao Dou, Guoqiang Yin, Yingde Cuiac e Xunjun Chen (2017) em que a queratina quimicamente extraída foi misturada com álcool polivinílico. Nessa pesquisa, a extração de queratina das penas aconteceu por meio da imersão de penas em etanol seguido por tratamento com ácido peracético. Essa solução passou por uma malha de náilon e em seguida, foi encaminhada para uma diálise em tubos de diálise contra água destilada em temperatura ambiente. Após essa etapa, houve a filtração, lavagem e secagem da queratina. Essa última foi misturada com o PVA para melhorar a interação entre as proteínas e para ajudar na fiação. Essa solução foi depositada na seringa do eletrofiador que possui um mandril cilíndrico giratório envolto em folha de alumínio como placa de coleta e, nesse aparelho, as nanofibras foram geradas (He *et al.*, 2017) (figura 4).

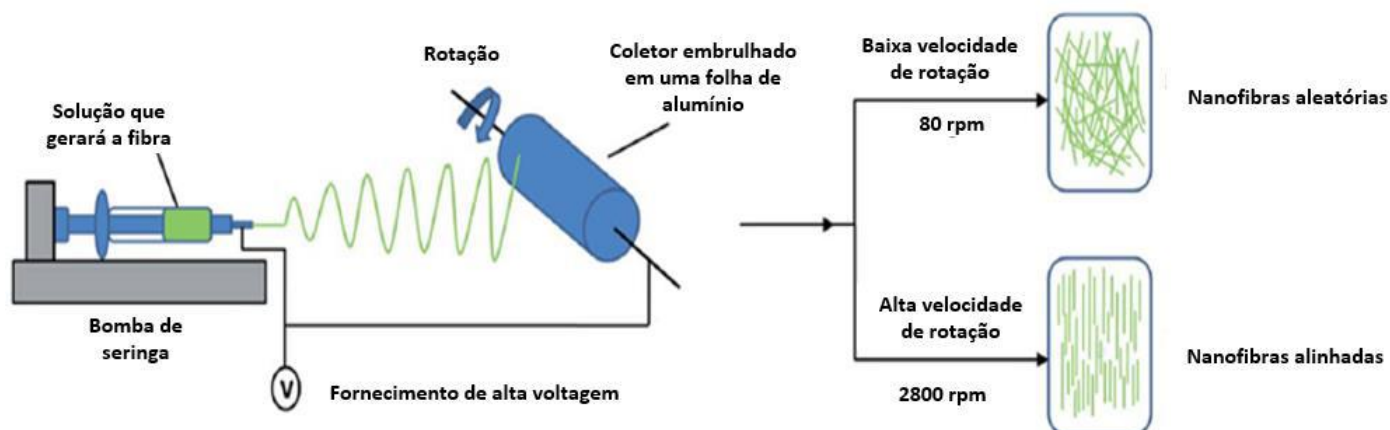


Figura 4 - Representação esquemática da eletrofiação aplicada por He et al. (2017) (imagem retirada de He et al., 2017).

Os poucos trabalhos que descrevem a transformação da queratina de penas em fibras utilizam métodos químicos para a extração da proteína. Estes procedimentos, além de, muitas vezes, exigir compostos caros ou tóxicos, também apresentam gastos de água durante as etapas de lavagem com geração de efluentes potencialmente problemáticos, contendo os solventes e agentes redutores empregados durante a extração. Trabalhos anteriores do nosso grupo com microrganismos queratinolíticos mostraram que antes da completa hidrólise das penas, os microrganismos queratinolíticos desmontam sua complexa estrutura, apresentando grande quantidade de queratinas com massa molecular de aproximadamente 10 kDa no sobrenadante de cultura. Este fato abre a possibilidade da utilização de processos fermentativos empregando microrganismos queratinolíticos para a obtenção de queratinas com características adequadas para a fiação.

1.5. Queratinases e microrganismos queratinolíticos

Os microrganismos sintetizam enzimas que possuem diversas aplicações industriais (Mazotto *et al.*, 2013). Em 2017, o mercado global de enzimas valia US\$ 7,1 bilhões e estima-se que até 2024, ele vai atingir US\$ 10,5 bilhões (Rigo *et al.*, 2021). Nesse sentido, as queratinases são um exemplo de enzimas que apresentam várias aplicações, assim como os hidrolisados proteicos gerados por elas. Elas podem ser usadas, por exemplo, na produção de fertilizantes, de couro e de ração animal. Na produção de biofertilizantes, os hidrolisados proteicos resultantes do processamento enzimático ou microbiano das penas podem servir

uma fonte alternativa de nitrogênio, visto que este é um componente importante para o desenvolvimento da planta e essa é uma forma de diminuir o consumo excessivo de fertilizantes inorgânicos convencionais (De Menezes *et al.*, 2021). No caso da ração animal, as penas por serem compostas, majoritariamente, por queratina, representam um material barato para ser empregado na obtenção de proteínas para a suplementação da dieta animal. No entanto, os métodos usados, normalmente, nesse processo envolvem altas temperaturas ou substâncias químicas e estes são procedimentos caros e seu produto final é pouco digerível. Com isso, as enzimas capazes de degradar as penas são uma possível solução para a síntese de hidrolisados proteicos com uma maior qualidade nutricional (Zorro, 2018). As queratinases também vêm sendo estudadas dentro da indústria têxtil, pois essas enzimas podem substituir compostos tóxicos e pouco sustentáveis como cal e sulfeto de sódio, utilizados na depilação de pele de animais, para tornar a confecção do couro mais ecológica (Santha Kalaikumari *et al.*, 2019).

A maior parte das queratinases são endopeptidases, contudo também existem aquelas que são exopeptidases do tipo aminopeptidases. As exopeptidases executam sua atividade catalítica nas extremidades da proteína, na região N-terminal ou na região C-terminal e podem ser divididas em aminopeptidases e carboxipeptidases. As aminopeptidases atuam na região N-terminal o que levar ao desprendimento de um aminoácido, um dipeptídeo ou um tripeptídeo, enquanto as carboxipeptidases atuam na região C-terminal o que resulta no desprendimento de um aminoácido ou dipeptídeo. Já, as endopeptidases fazem a clivagem no interior da cadeia polipeptídica da proteína (Ruffin, *et al.* 1979 *apud* Cortezi, 2009). A grande parte dos microrganismos queratinolíticos produzem queratinases extracelulares e sua massa molecular costuma estar na faixa de 15 e 250 kDa, porém a imensa maioria possui massa molecular menor que 50 kDa (Da Rosa, 2020). Além disso, a maioria das queratinases descritas na literatura é levemente termofílicas e alcalinas e normalmente, fazer parte do grupo das metalopeptidases e serinapeptidases (Sypka *et al.*, 2021) que conseguem reconhecer substratos hidrofóbicos, romper ligações peptídicas e causar alguma desestabilização em pontes de dissulfeto (Li *et al.*, 2021). As metaloproteases necessitam da presença de íons de metal para realizar a atividade de catálise enzimática e costumam ser encontradas em bactérias gram-negativas, enquanto serina proteases têm resíduos de serina em seu sítio ativo e costumam ser produzidas por bactérias gram-positivas (Bittencourt, 2014; Zorro, 2018)

Em contraponto, mesmo com essas informações, conhece-se pouco sobre o mecanismo de ação catalítica dessas proteases, por isso foram formuladas duas hipóteses

que poderiam explicar esse processo. O primeiro mecanismo descrito de hidrólise da queratina envolve a sua desnaturação por meio da ruptura das pontes dissulfeto por sulfitólise (figura 5) através da produção de agentes redutores como sulfito, cisteínas, glutathione, ácido glicólico, etc (Sypka et al., 2021). Os primeiros trabalhos a descrever este método estudavam fungos queratinolíticos. Esses fungos quando são colocados em meios ricos em cistina (cisteínas ligadas por uma ponte de dissulfeto) e durante sua metabolização, liberam sulfato e sulfito e este permite a quebra das pontes de dissulfeto, pois o sulfito se liga a cistina da queratina e causa a formação de cisteína e S-sulfocisteína (Kunert, 1992 *apud* Duarte, 2009).

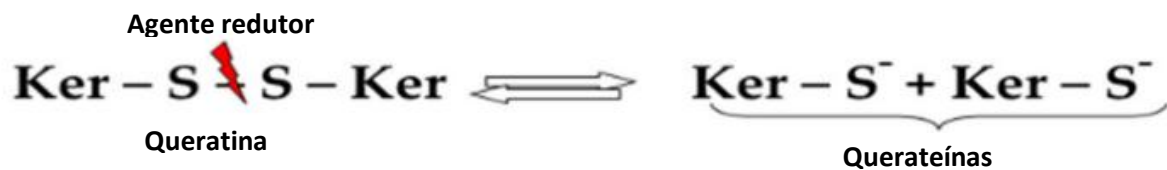


Figura 5- Mecanismo de sulfitólise (Perta-Crisan *et al.*, 2021)

O segundo mecanismo envolve a ação de uma oxireductase com ação redutora sobre as pontes dissulfeto (dissulfeto redutase) antes da hidrólise da queratina (figura 6). Algumas das enzimas descritas com atividade de dissulfeto redutase são cisteína dioxigenase e glutathione redutase (Qiu *et al.*, 2020).

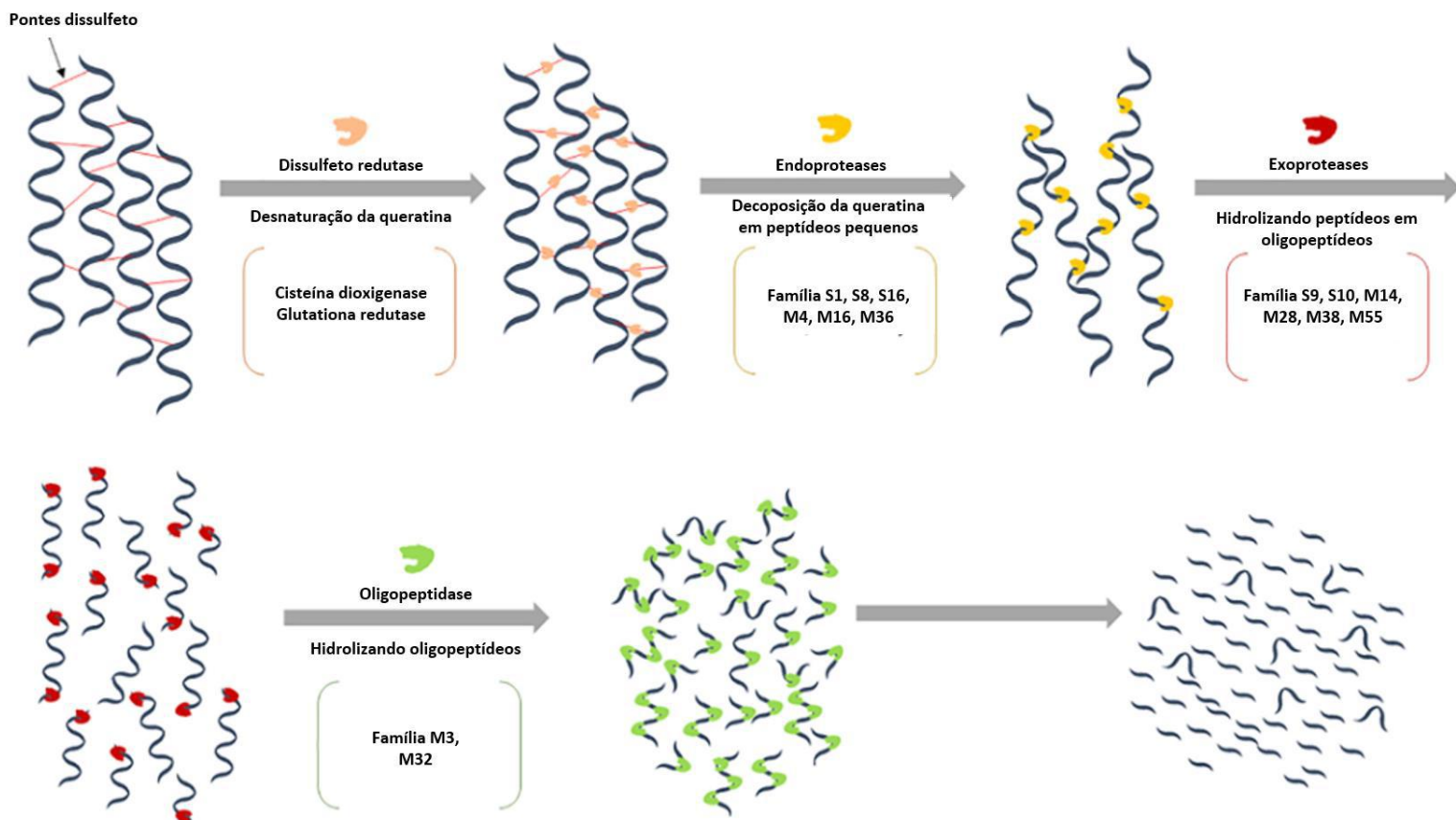


Figura 6 - Mecanismo proposto da degradação da queratina pela ação cooperativa de enzimas (Retirado de Qiu et al., 2020)

Por outro lado, já há relatos na literatura de enzimas que conseguem exercer atividade queratinolítica sem a ajuda de enzimas auxiliares. Esse fenômeno já foi verificado em serino queratinases de *Bacillus thuringiensis* AD-12, *Actinomadura keratinilytica* Cpt29, *Bacillus pumilus* K-9, *Caldicoprobacter algeriensis*, *Bacillus subtilis* DP1 e metaloproteases de *Acinetobacter* sp. R-1 e *Bacillus pumilus* NRC21 (Duffeck, 2020).

O fato de a queratina ser uma das biomassas mais geradas e mesmo assim, não se acumular em ambientes ecologicamente estáveis é forte indício de que as queratinases são encontradas, facilmente, em locais por todo o mundo (Sypka *et al.*, 2021). Os microrganismos queratinolíticos são aqueles que podem sintetizar queratinases para que estas clivem as ligações peptídicas da queratina e os produtos resultantes desse processo sirvam como fontes de carbono, nitrogênio e energia (Da Rosa, 2020). Eles podem ser espécies de fungos, bactérias e actinomicetos (Anton e Umesh, 2022) e cada ano, novas cepas de microrganismos com potencial de degradar queratina são descobertas e podem vir de várias áreas como aterros

com resíduos avícolas, superfície da pele ou solo ou água de regiões próximas a matadouros de animais (Sypka *et al.*, 2021).

Os fungos queratinolíticos, normalmente pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Microsporium*, *Trichoderma* e *Chrysosporium* (Calin *et al.*, 2017). Em ninhos e pellets (tipo de ração) de pássaros, em geral, os fungos mais presentes são do gênero *Chrysosporium*. Em solos, especialmente aqueles com alta quantidade de matéria orgânica, sobretudo queratina, é mais comum encontrar fungos saprófitas (Bohacz e Kornilłowicz-Kowalska, 2019), porém os fungos dermatófitos também podem ser isolados desse ambiente. Estes últimos apresentam uma boa capacidade de hidrólise de queratina e de produção de queratinases para que possam parasitar a superfície da pele de animais e humanos e causar doenças. Entre esses patógenos, os que possuem maior destaque são do gênero *Microsporium* sp. e *Trichophyton* sp. No entanto, apesar das queratinases dos fungos serem produzidas em grande quantidade, com baixo custo e com um fácil processamento downstream e serem cultivadas em substratos econômicos, a maioria dos fungos queratinolíticos são danosos a saúde de distintos animais e humanos e sua aplicação em processos biotecnológicos não é indicada (Zorro, 2018; Anton e Umesh, 2022).

As bactérias com o potencial de hidrolisar penas são, comumente, achadas em solos de indústrias de couro e em solos que possuem a constante presença de aves. Elas são capazes de crescer depressa e de manter a ação enzimática mesmo com variações de pH e altas temperaturas. Além disso, há casos em que o hidrolisado de proteínas obtido por meio da degradação de penas com bactérias apresenta propriedades anti-hipertensivas e antioxidantes, que são de interesse para a indústria médica (Anton e Umesh, 2022). As bactérias queratinolíticas podem ser gram-positivas ou gram-negativas. Algumas bactérias queratinolíticas gram-negativas pertencem aos gêneros *Chryseobacterium* sp., *Fervidobacterium* sp., *Vibrio* sp., *Serratia* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Lysobacter* sp. e *Pseudomonas* sp. (Da Rosa, 2020). O gênero *Serratia* sp, por exemplo, gera uma grande quantidade de proteínas solúveis, enquanto a *Chryseobacterium* sp. pode degradar penas sem a necessidade de nenhum pré-tratamento, o que é indicativo de uma boa atividade queratinolítica (Zorro, 2018). No caso das bactérias gram -positivas, algumas fazem parte dos gêneros *Streptomyces* sp., *Clostridium* sp., *Arthrobacter* sp., *Actinomycetes* sp., *Microbacterium* sp. e *Bacillus* sp. (Da Rosa, 2020). Dentre estas, os *Actinomycetes* sp. e *Bacillus* sp. são as mais encontradas na plumagem de aves e conseguem decompor completamente a queratina dura, existente no cabelo, unhas e penas (Zorro, 2018). Em

contrapartida, apesar de haver vários gêneros de bactérias gram-positivas com potencial queratinolítico, aquele que apresenta maior destaque é o *Bacillus* sp. Estes últimos são bons produtores de enzimas e conseguem gerar metabólitos secundários com capacidade bioativa (Da Rosa, 2020).

2 JUSTIFICATIVA

A indústria têxtil cresce cada vez mais atualmente, e junto com esse crescimento muitos impactos ambientais que ela causa também aumentam significativamente. Uma das etapas que pode aumentar ou reduzir esses danos é a escolha da matéria prima para a elaboração das fibras dos tecidos. As principais fibras usadas atualmente são constituídas ou de fibras naturais ou de fibras sintéticas. O algodão é a fibra natural mais encontrada no mercado e para a sua formação é preciso uma grande quantidade de agrotóxicos e água, o que pode levar a poluição do solo, água e ar e a aparição de doenças em trabalhadores. Já as fibras sintéticas são criadas a partir de fontes não renováveis, como o petróleo, o que pode resultar na emissão de gases estufa, além de dificultar a degradação dessas fibras na natureza.

Em paralelo, a indústria avícola também vem crescendo o que gera uma grande produção de resíduos como as penas, e o descarte inadequado destas afeta negativamente o meio ambiente, pois ocasiona poluição por dióxido de enxofre no solo e no ar. Desse modo, novas formas de reaproveitar as penas vem sendo investigadas. Como as penas são basicamente formadas por queratina, este resíduo pode ser aproveitado para a criação de fibras sustentáveis, que amenizem os problemas ambientais causados pela indústria têxtil. No entanto, a extração dessa proteína das penas costuma envolver o uso de compostos químicos e alguns deles, quando utilizados em larga escala, podem ser tóxicos, pouco sustentáveis, muito caros ou podem degradar demais as penas e originar proteínas muito pequenas para serem fiadas. Sendo assim, esse projeto busca promover a extração da queratina das penas por meio do uso de microrganismos queratinolíticos, visto que estes são capazes de solubilizar penas. Esse processo pode tornar a fabricação de fibras de queratina mais ecológica e oferecer um produto inovador.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Selecionar a cepa bacteriana, entre todos os microrganismos isolados do solo, capaz de degradar as penas de forma mais eficiente para que futuramente, ela seja usada na obtenção de queratina das penas por processos fermentativos para a fabricação de fibras têxteis.

3.2 Objetivos específicos

- Isolar microrganismos que possuem potencial para degradar penas;
- Identificar preliminarmente os microrganismos isolados;
- Identificar os microrganismos produtores de peptidases;
- Selecionar entre os microrganismos proteolíticos aqueles que apresentem melhor potencial de hidrólise de penas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção e processamento das penas de frango

Primeiramente, as penas foram coletadas da granja Rica Alimentos, localizada na Estrada dos Teixeiras, 1091 - Taquara, Rio de Janeiro – RJ (coordenadas - 22.909498802827954, -43.420822128457466). Em seguida, elas foram lavadas com água corrente e detergente neutro, enxaguadas extensivamente, e depois, foram imersas em etanol 70% por aproximadamente 30 min, para a remoção da gordura das penas, e deixadas para secar à temperatura ambiente.

4.2 Isolamento de microrganismos queratinolíticos de amostras de solo

Um grama das penas já lavadas foi enterrado em um vaso com a planta *Juniperus chinensis* (pinheiro), durante uma semana. Após esse período, um grama dessa terra com as penas foi retirado da área perto da raiz e foi colocado em um Erlenmeyer com 100 mL de meio rico [g/L: extrato de levedura 5; sacarose 5; peptona 5; cloreto de potássio (KCl) 5; penas 10] e outro grama dessa terra foi colocado em outro Erlenmeyer com 100 mL de meio pobre [g/L: cloreto de sódio (NaCl) 0,085; penas 10]. Após uma semana, foram feitas diluições seriadas de cada um desses meios em salina 0,85% e essas diluições foram de 10^0 (solução não diluída) até 10^{-7} . Uma alíquota (100 μ L) de cada uma dessas diluições foi despejada, em duplicata, em placas diferentes com meio ágar nutriente (g/L: ágar 20, pó de ágar nutriente 13) e depois, essa gota foi espalhada com uma alça Drigalski. Após 24h de incubação a 28°C, as colônias, que cresceram nas placas das diluições e que pareceram diferentes, morfológicamente, à olho nu foram esgotadas três vezes e cultivadas em placas separadas com meio ágar nutriente. As amostras puras obtidas foram congeladas em meio caldo nutriente com glicerol 20%.

4.3 Espectrometria de massas (MALDI- TOF) dos microrganismos isolados

Esse procedimento foi utilizado para a identificação parcial dos microrganismos que isolamos do solo por meio da averiguação do perfil de proteínas presentes na superfície de cada um deles. Nesse experimento, cada microrganismo foi estriado em uma placa com ágar

nutriente, que foi dividida em seis partes para que possam ser estriados seis microrganismos diferentes em uma mesma placa. Essas placas foram incubadas à temperatura de 28°C, durante 24 horas. Em seguida, coletou-se, com o auxílio de um palito de dente, uma alíquota de uma colônia de cada microrganismo que cresceu e essa amostra foi depositada, em duplicata, em uma placa de espectrometria de massas. Posteriormente, foram aplicadas matrizes de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (5 μ g/ml em TFA 0,1% em ACN 50%) e isso foi levado espectrômetro de massa (MALDI-TOF MS), no Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica (do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ).

4.4 Seleção dos microrganismos degradadores de proteínas

Foram preparadas placas com meio ágar caseína [g/L: cloreto de sódio (NaCl) 8,5; extrato de levedura 1; leite em pó 10; ágar 20] e estas foram furadas 7 vezes com o auxílio de uma pipeta Pasteur para a formação de poços com 8 mm de diâmetros. Em paralelo, uma alçada de cada microrganismo esgotado foi colocada em um microtubo com 400 μ L de salina estéril 0,85%. Em seguida, após homogeneização com a pipeta, 20 μ L desta mistura foram depositados em cada poço da placa. Esse procedimento foi realizado em duplicata com todos os microrganismos isolados. Após 24 h de incubação, os microrganismos que conseguiram degradar a caseína presente no meio formaram um halo que foi medido com uma régua. Os microrganismos positivos para a hidrólise de caseína foram selecionados para o crescimento em meio contendo penas.

4.5 Determinação dos microrganismos queratinolíticos

Os microrganismos que formaram halos no ágar caseína foram coletados de suas respectivas placas de ágar nutriente com o auxílio de uma alça e postos, em triplicata, em Erlenmeyers de 125 mL com 25 mL de meio para a produção de hidrolisados e queratinases [fosfato dissódico (Na_2HPO_4) 0,6M; fosfato monopotássico (KH_2PO_4) 0,4M, pH 8,0; sulfato de magnésio (MgSO_4) 0,5 mM; cloreto de manganês (MnCl_2) 0,5mM, cloreto de cálcio (CaCl_2) 0,5mM penas 1,5%]. Em seguida, esses Erlenmeyes foram agitados à 150 rpm e a uma temperatura de 28°C durante 120h (5 dias). Após esse tempo, o conteúdo desses Erlenmeyers foi vertido em um funil que continha um papel filtro (Whatman nº1) para retenção das penas que não foram degradadas durante esse período e o sobrenadante coletado

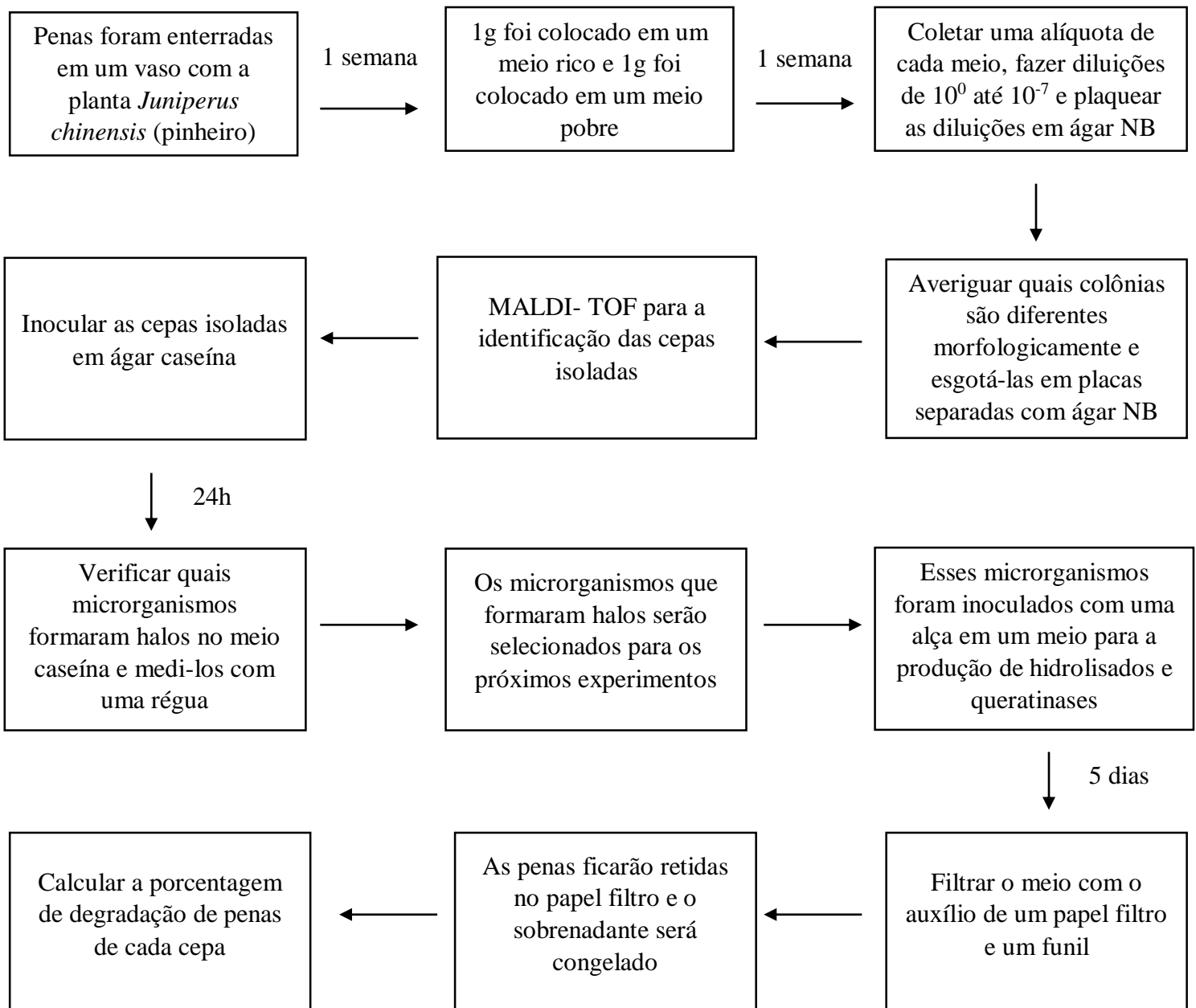
foi depositado em um tubo Falcon que foi levado para o congelador. Posteriormente, água sanitária também foi derramada no filtro para desinfetar o papel filtro e este último secou, completamente, a temperatura ambiente durante o tempo necessário (dias). O papel filtro foi pesado antes e depois desses processos, pois ambos os pesos foram subtraídos para a averiguação do peso das penas não degradadas. Com isso, esse resultado permite verificar os microrganismos que conseguem fazer a hidrólise de penas e as porcentagens de degradação de penas de cada microrganismo.

4.6 Seleção do microrganismo que obteve mais sucesso na hidrólise de penas

Os microrganismos previamente selecionados foram cultivados em um Erlenmeyer de 125 mL com 30 mL caldo nutriente, durante 48 horas e em uma agitação de 150 rpm. A seguir, preparou-se um inóculo padronizado de cada microrganismo com uma DO de 0,4 (leitura no espectrofotômetro a 600 nm). Após mensuração por espectrofotometria, as bactérias foram transferidas, separadamente e em duplicata, para Erlenmeyers de 125 mL com 50 mL de meio para a produção de hidrolisados e queratinases [fosfato dissódico (Na_2HPO_4) 0,6M; fosfato monopotássico (KH_2PO_4) 0,6M, pH 8,0; sulfato de magnésio (MgSO_4) 0,5mM; cloreto de manganês (MnCl_2) 0,5mM; cloreto de cálcio (CaCl_2) 0,5mM penas 1,5%]. Esses recipientes permaneceram sob uma agitação de 150 rpm e a uma temperatura de 28°C por 120 horas (5 dias) e depois desse tempo, seu conteúdo foi vertido em um funil, que continha um papel filtro. Desse modo, como no experimento anterior, as penas que não foram degradadas ficaram presas no papel filtro (Whatman nº1) e o sobrenadante foi colhido em tubos Falcon, que foram congelados. Em seguida, foi despejada água sanitária nos papéis filtro para desinfetá-los e estes foram postos para secar à temperatura ambiente durante o tempo necessário (dias). Após esse período, a porcentagem de penas hidrolisadas por cada microrganismo foi calculada por peso seco, da mesma forma que método anterior. Nesse sentido, o experimento padroniza o inóculo inicial de células e as condições para a degradação de penas com o objetivo de selecionar microrganismo que apresenta maior eficiência nesse processo.

4.7 Quantificação de proteínas

Os sobrenadantes resultantes dos testes de seleção dos microrganismos degradadores de penas e de seleção do microrganismo que obteve mais sucesso na hidrólise de penas, presentes nos tubos falcon congelados, foram descongelados a temperatura ambiente e 1 mL de cada um deles foi passado, separadamente para 3 microtubos. Em seguida, esses microtubos foram centrifugados a 10000 rpm por 10 minutos e 20 µL do sobrenadante foi usado para medir a concentração de proteínas, segundo o método de Lowry et al. (1951) com o uso de soro albumina bovina como padrão. Nessa técnica, a leitura foi realizada a 617 nm no espectrofotômetro.



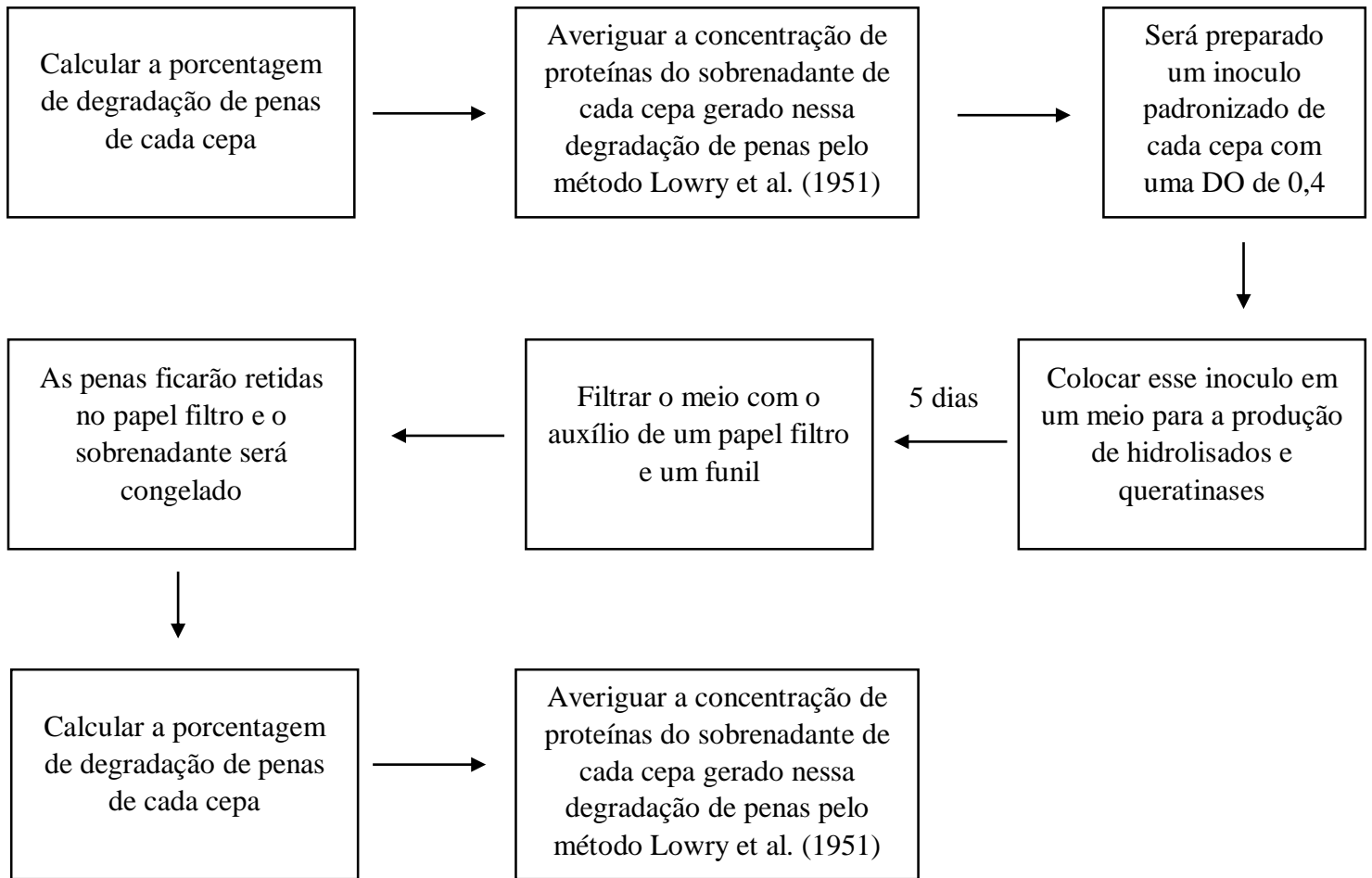


Figura 7- Organograma com as etapas dos experimentos realizados

5. RESULTADOS

5.1 Isolamento de microrganismos queratinolíticos de amostras de solo

Foram isoladas 22 colônias das amostras de solo com penas, de acordo com as diferenças morfológicas existentes entre essas colônias observadas a olho nu nas placas semeadas com as diluições do meio rico e do meio pobre. Quinze colônias foram isoladas a partir do meio rico e sete foram isoladas a partir meio pobre. As colônias que vieram do meio rico foram nomeadas MR 1, MR 2, MR 3, MR 4.1, MR 4.2, MR 5.1, MR 5.2, MR 6.1, MR 6.2, MR 7, MR 8, MR 9, MR 10, MR11 e MR 12, enquanto as colônias que vieram do meio pobre foram nomeadas MP 1, MP 2.1, MP 2.2, MP 3, MP 4, MP 5 e MP 6.

5.2 Identificação parcial por espectrometria de massas (MALDI- TOF) dos microrganismos isolados

O MALDI- TOF conseguiu gerar resultados para 10 das 22 colônias isoladas, MP 1, MP 2.2, MP 3, MP 4, MP 6, MR 2, MR 4.1, MR 4.2, MR 5.2, MR 11. No caso de MP 1, a pontuação indica que, provavelmente, é um *Bacillus cereus*, pois ambos, primeiro e segundo microrganismos mais parecidos, têm alto score na segunda amostra testada (quadro 2). Os quadros 3 e 4 auxiliam na interpretação dos dados gerados pelo MALDI-TOF.

Nome do Analito	Microrganismos isolados	Microrganismo mais parecido	Pontuação 1	Segundo microrganismo mais parecido	Pontuação 2
D1 (++) (A)	MP 1	<i>Bacillus cereus</i>	2.025	<i>Bacillus cereus</i>	1.901
D2 (++) (A)	MP 1	<i>Bacillus cereus</i>	2.152	<i>Bacillus cereus</i>	2.142
D3 (-) (C)	MP 2.1	Identificação não confiável	1.242	Identificação não confiável	1.212
D4 (-) (C)	MP 2.1	Nenhum pico encontrado	< 0	Nenhum pico encontrado	< 0
D5 (+) (B)	MP 2.2	<i>Kocuria marina</i>	1.769	Identificação não confiável	1.682
D6 (+) (B)	MP 2.2	<i>Kocuria marina</i>	1.952	<i>Kocuria marina</i>	1.875
D7 (+) (B)	MP 3	<i>Brevibacillus reuszeri</i>	1.876	Identificação não confiável	1.455
D8 (++) (A)	MP 3	<i>Brevibacillus reuszeri</i>	2.073	Identificação não confiável	1.641
D9 (++) (A)	MP 4	<i>Bacillus cereus</i>	2.227	<i>Bacillus cereus</i>	2.189
D10 (++) (A)	MP 4	<i>Bacillus cereus</i>	2.21	<i>Bacillus cereus</i>	2.181
D11 (-) (C)	MP 5	Identificação não confiável	1.31	Identificação não confiável	1.235
D12 (-) (C)	MP 5	Identificação não confiável	1.186	Identificação não confiável	1.18
E1 (++) (A)	MP 6	<i>Brevibacillus reuszeri</i>	2.008	Identificação não confiável	1.472
E2 (-) (C)	MP 6	Identificação não confiável	1.342	Identificação não confiável	1.231
E3 (-) (C)	MR1	Identificação não confiável	1.449	Identificação não confiável	1.372
E4 (-) (C)	MR 1	Identificação não confiável	1.452	Identificação não confiável	1.447
E5 (+) (B)	MR 2	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	1.986	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	1.828
E6 (+) (B)	MR 2	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	1.92	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	1.908
E7 (-) (C)	MR 3	Identificação não confiável	1.337	Identificação não confiável	1.214
E8 (-) (C)	MR 3	Identificação não confiável	1.332	Identificação não confiável	1.27
E9 (++) (A)	MR 4.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.059	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.022
E10 (++) (A)	MR 4.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.287	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.214
E11 (++) (A)	MR 4.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.16	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.083
E12 (+++) (A)	MR 4.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.372	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.315
F1 (-) (C)	MR 5.1	Identificação não confiável	1.225	Identificação não confiável	1.213
F2 (-) (C)	MR 5.1	Identificação não confiável	1.376	Identificação não confiável	1.3
F3 (++) (A)	MR 5.2	<i>Brevundimonas diminuta</i>	2.107	<i>Brevundimonas diminuta</i>	1.991
F4 (++) (A)	MR 5.2	<i>Brevundimonas diminuta</i>	2.006	<i>Brevundimonas diminuta</i>	1.81
F5 (-) (C)	MR 6.1	Identificação não confiável	1.363	Identificação não confiável	1.26
F6 (-) (C)	MR 6.1	Identificação não confiável	1.366	Identificação não confiável	1.289
F7 (-) (C)	MR 6.2	Nenhum pico encontrado	< 0	Nenhum pico encontrado	< 0
F8 (-) (C)	MR 6.2	Identificação não confiável	1.37	Identificação não confiável	1.282
F9 (-) (C)	MR 7	Identificação não confiável	1.666	Identificação não confiável	1.55
F10 (-) (C)	MR 7	Identificação não confiável	1.658	Identificação não confiável	1.558
F11 (-) (C)	MR 8	Identificação não confiável	1.607	Identificação não confiável	1.557
F12 (-) (C)	MR 8	Nenhum pico encontrado	< 0	Nenhum pico encontrado	< 0
G1 (-) (C)	MR 9	Nenhum pico encontrado	< 0	Nenhum pico encontrado	< 0
G2 (-) (C)	MR 9	Nenhum pico encontrado	< 0	Nenhum pico encontrado	< 0
G3 (-) (C)	MR 10	Nenhum pico encontrado	< 0	Nenhum pico encontrado	< 0
G4 (-) (C)	MR 10	Nenhum pico encontrado	< 0	Nenhum pico encontrado	< 0
G5 (-) (C)	MR 11	Identificação não confiável	1.665	Identificação não confiável	1.447
G6 (+) (B)	MR 11	<i>Bacillus cereus</i>	1.855	<i>Bacillus cereus</i>	1.821
G7 (-) (C)	MR 12	Nenhum pico encontrado	< 0	Nenhum pico encontrado	< 0
G8 (-) (C)	MR 12	Nenhum pico encontrado	< 0	Nenhum pico encontrado	< 0

Quadro 1– Resultados da identificação dos microrganismos isolados

Pontuação	Descrição	Símbolos	Cor
2.300 ... 3.000	Identificação de espécies altamente provável	(+++)	verde
2.000 ... 2.299	Identificação segura do gênero, identificação provável da espécie	(++)	verde
1.700 ... 1.999	Identificação provável de gênero	(+)	amarelo
0.000 ... 1.699	Identificação não confiável	(-)	vermelho

Quadro 2 – Explicação da pontuação usada no MALDI-TOF

Categoria	Descrição
A	Consistência de Espécies: A melhor correspondência foi classificada como 'verde' (veja acima). Outras correspondências 'verdes' são da mesma espécie que a primeira. Outras correspondências 'amarelas' são pelo menos do mesmo gênero que a primeira.
B	Consistência de gênero: A melhor correspondência foi classificada como 'verde' ou 'amarela' (veja acima). Outras correspondências 'verde' ou 'amarelo' têm pelo menos o mesmo gênero que o primeiro. As condições de consistência das espécies não são cumpridas
C	Sem consistência: Nem espécie nem consistência de gênero (Por favor, verifique sinônimos de nomes ou mistura microbiana).

Quadro 3 - Explicação das categorias do MALDI – TOF

No caso de MP 2.2 os resultados sugerem que o isolado pode pertencer ao gênero *Kocuria*, mas não há resultados consistentes que permitam concluir que é da espécie *Kocuria* (quadro 2). Já no caso de MP 3, os dados sugerem se tratar de um microrganismo do gênero *Brevibacillus*, sem consistência para afirmativa de espécie, embora haja uma indicação para *Brevibacillus reuszeri* (quadro 3). Os resultados da amostra MP4 identificaram uma maior compatibilidade com *Bacillus cereus* (quadro 1). Em relação ao isolado MP 6, mesmo que ele tenha apresentado uma forte correlação com o gênero *Brevibacillus* (quadro 1), não se pode ter certeza que é da espécie *Brevibacillus reuszeri* e não houve reprodutibilidade nos resultados.

Para os dados referentes a MR 2, há um indício de que o microrganismo pertença ao gênero *Sphingobacterium*, contudo, não se pode afirmar que é um *Sphingobacterium multivorum* como aponta no quadro 1. Já em MR 4.1 e MR 4.2 são altas as chances de serem *Pseudomonas aeruginosa*, sendo que no caso de MR 4.2 é considerado altamente provável. De acordo com os resultados obtidos para MR 5.2, este isolado apresentou uma presunção de gênero para *Brevundimonas*, possivelmente *B. diminuta* (quadro 1). E por fim, MR11, cujos resultados apontam, a probabilidade de ser pertencente ao gênero *Bacillus*, mas sem indicação confiável de espécie (quadro 1).

5.3 Seleção dos microrganismos degradadores de proteínas

Apenas 9 das 22 colônias isoladas das amostras de solo conseguiram mostrar atividade proteolítica e degradaram a caseína presente no ágar caseína, o que foi observado pela

formação halos. Dessas 9 colônias, duas vieram do meio pobre com penas (MP 1 e MP 4) e 7 vieram do meio rico (MR 4.1, MR 4.2, MR 7, MR 8, MR 10, MR 11 e MR 12). Ademais, nesse experimento, os resultados tendem a apontar que MR 10 teve o maior tamanho médio de halos (figura 8).

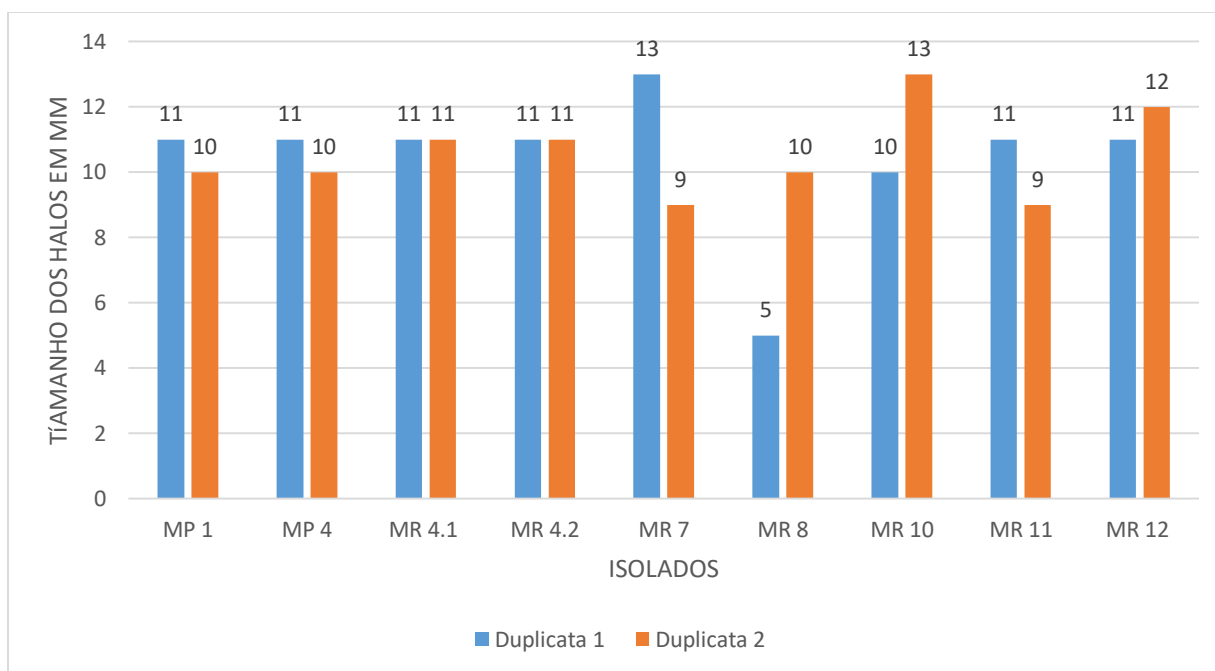


Figura 8 – Gráfico com as medidas dos halos gerados no ágar caseína das amostras positivas com as medidas das duplicadas.

5.4 Determinação dos microrganismos queratinolíticos

Os microrganismos MP 1, MP 4, MR 4.1, MR 4.2, MR 7, MR 8, MR 10, MR 11, MR 12, foram os que geraram halos no ágar caseína no experimento anterior e por mostrarem atividade proteolítica foram selecionados para os testes de degradação de penas. Os resultados estão apresentados na figura 9. Averiguou-se que todos os microrganismos apresentaram atividade queratinolítica, porém os isolados MR10, MR11 e MR12 mostram uma inclinação a terem os melhores resultados prévios de degradações de penas. Os três degradaram cerca de 60% das penas, sendo que a MR12 possuiu a maior média de degradação (68,92%).

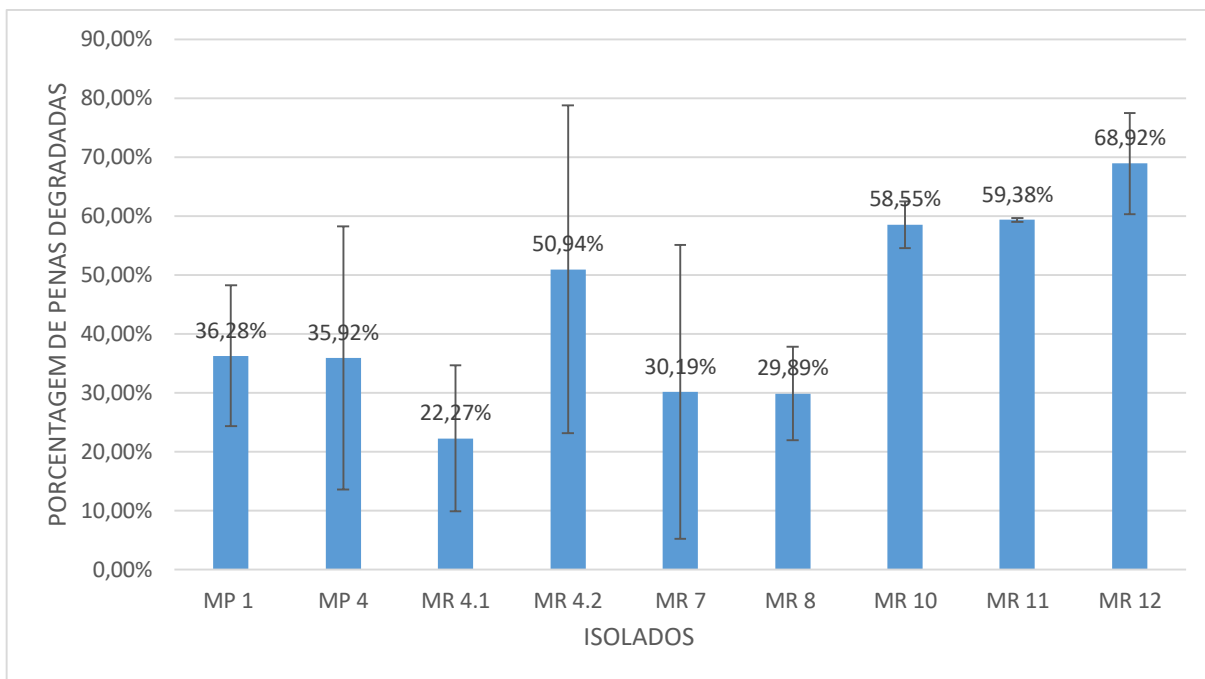


Figura 9 – Gráfico das porcentagens de penas degradadas, quando os microrganismos que formaram halos no ágar caseína foram retirados de suas respectivas placas de ágar nutriente e colocados diretamente no meio para a produção de hidrolisados e queratinases com o auxílio de uma alça.

5.5 Quantificação de proteínas presentes no sobrenadante do teste de seleção do microrganismo queratinolíticos

A dosagem de proteínas pelo método de Lowry et al. (1951) foi feita para averiguar a concentração de proteínas presentes nos sobrenadantes recolhidos após a degradação de penas para a seleção dos microrganismos que geram a maior quantidade de proteínas derivadas da degradação das penas (figura 12). Os gráficos tenderam a apontar que as amostras que possuíram as maiores concentrações de proteínas no sobrenadante de cultura foram as mesmas que tiveram as maiores degradações de penas no intervalo de tempo avaliado. MR 10, MR 11 e MR12 apresentaram concentração média de proteínas correspondente a 4,609 mg/mL, 5,891 mg/mL e 4,993 mg/mL. Portanto, foi visto que todos os microrganismos apresentaram proteínas em seus sobrenadantes após a degradação de penas, porém os resultados mostraram, inicialmente, que a maior concentração média de proteínas foi atingida por MR 11.

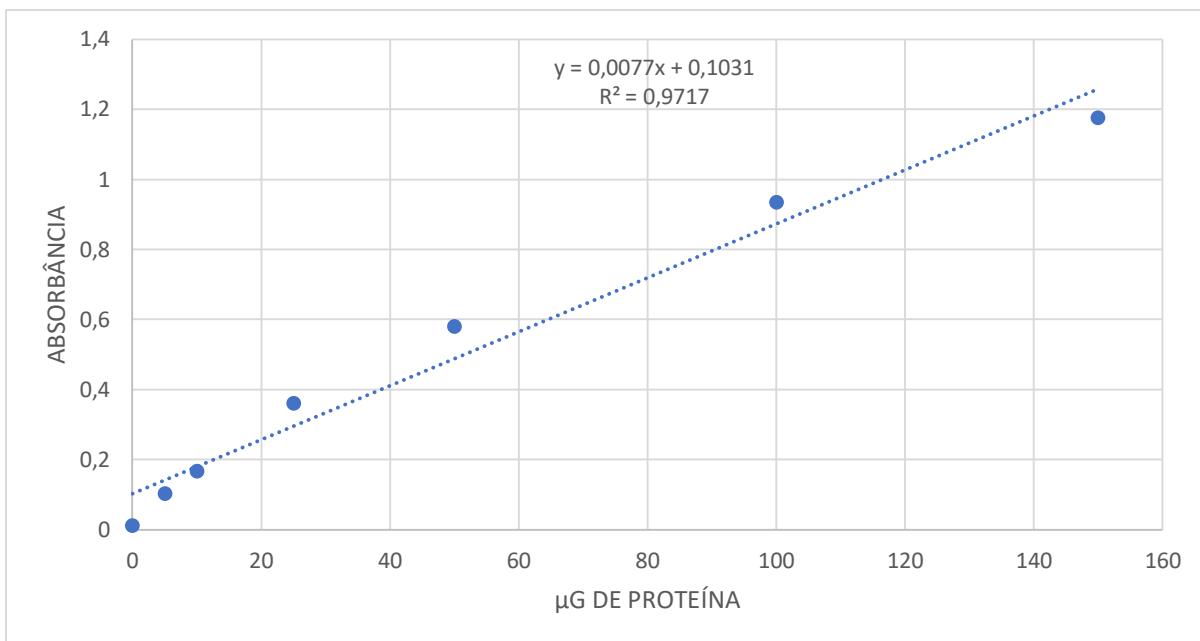


Figura 10 – Curva padrão usada para calcular a concentração de proteínas dos sobrenadantes de MP 1, MP 4, MR 4.1, MR 4.2, MR 7, MR 8, MR 10 e MR 12 gerados durante a degradação de penas para a seleção de microrganismos queratinolíticos

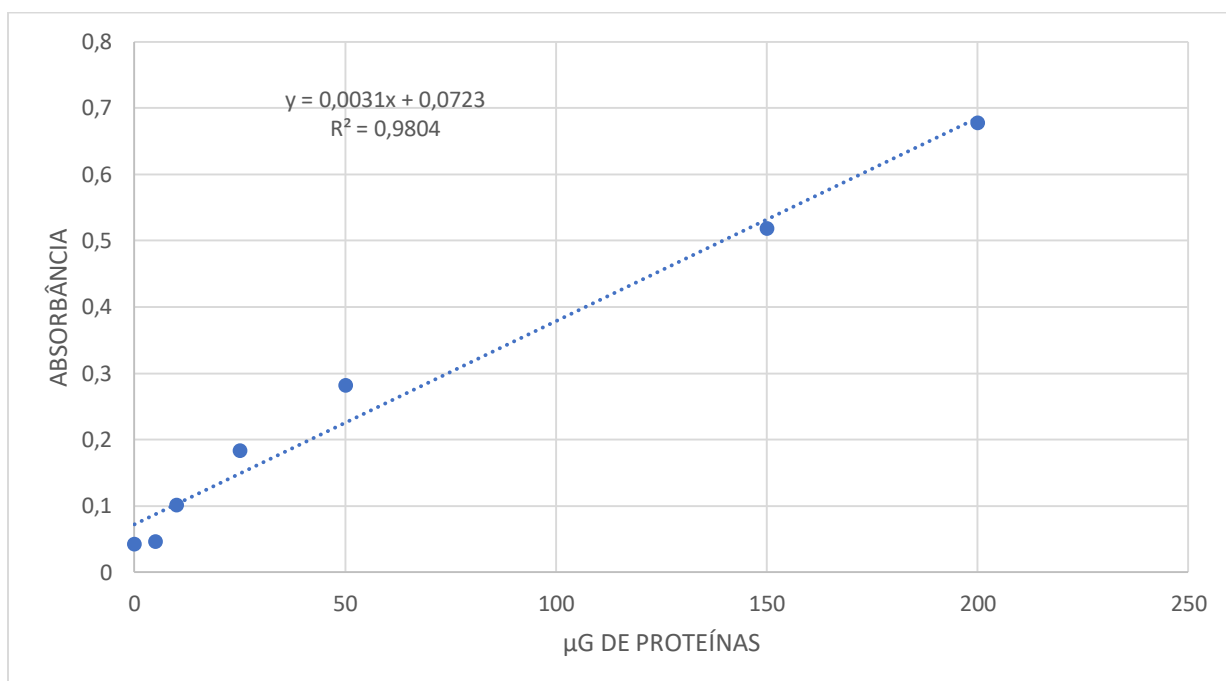


Figura 11- Curva padrão usada para calcular a concentração de proteínas dos sobrenadantes de MR 11 e de um dos sobrenadantes de MR 7 gerados durante a degradação de penas para a seleção de microrganismos queratinolíticos

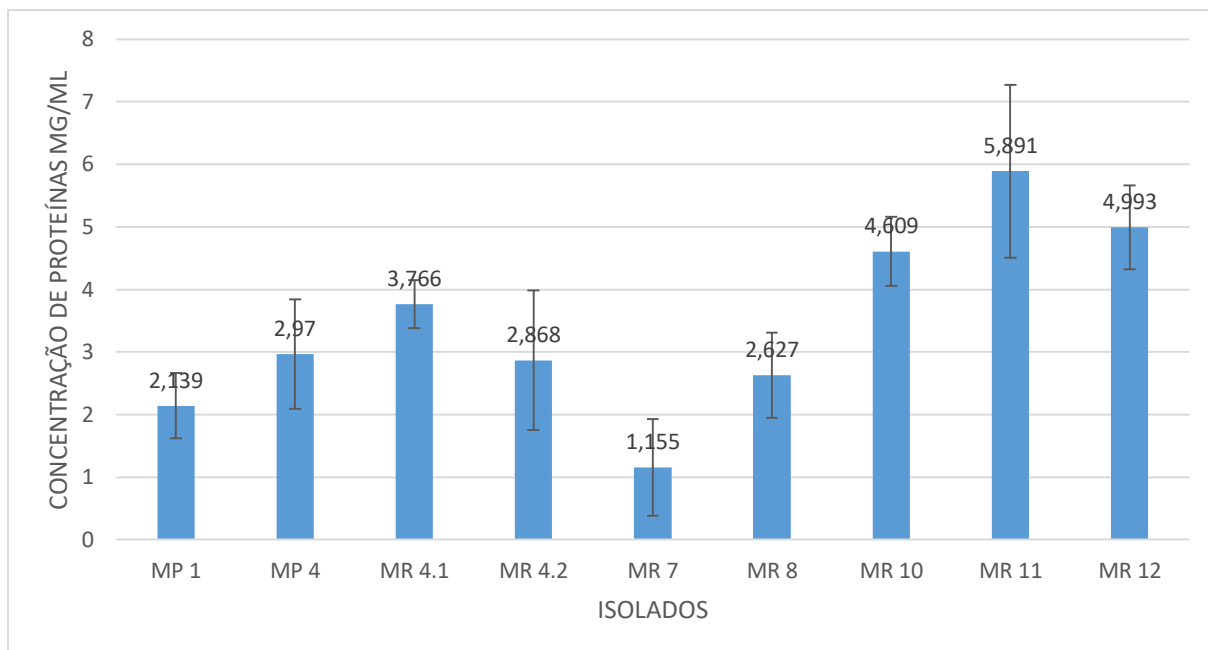


Figura 12- Gráfico da concentração de proteínas dos sobrenadantes gerados durante a degradação de penas para a seleção de microrganismos queratinolíticos

5.6 Seleção dos microrganismos através da degradação de penas

Neste teste, foi preparado um inóculo padronizado dos microrganismos proteolíticos e ele foi despejado no meio para a produção de hidrolisados e queratinases, em duplicata para análise do microrganismo que apresenta a maior atividade queratinolítica. Infelizmente nem todos os microrganismos foram testados, pois com a retomada das atividades laboratoriais após o afastamento devido a pandemia, muitas amostras que foram congeladas não foram ainda recuperadas. As amostras recuperadas e que apresentaram crescimento suficiente para dar prosseguimento aos experimentos foram MP 1, MP 4, MR 7 e MR 11. Dentre as demais amostras, MR 4.1 e MR10 não conseguiram ser recuperados após congelamento e os microrganismos MR 4.2, MR 8, MR10 e MR12 não cresceram no caldo nutriente para o experimento.

Para os microrganismos MP 1, MP7 e MR11, as porcentagens médias de penas hidrolisadas foram 9,47%, 12,36% e 48,36% respectivamente, porcentagens menores que as observadas previamente (36,3%, 30,2% e 59,5%, respectivamente). Já para MP 4 a degradação foi de 43,75%, maior que os 35,9% quantificados anteriormente (figura 13). Além disso, esses resultados mostram uma inclinação a indicar que MR 11 foi o microrganismo entre os 4 testados neste experimento com a melhor porcentagem de degradação de penas.

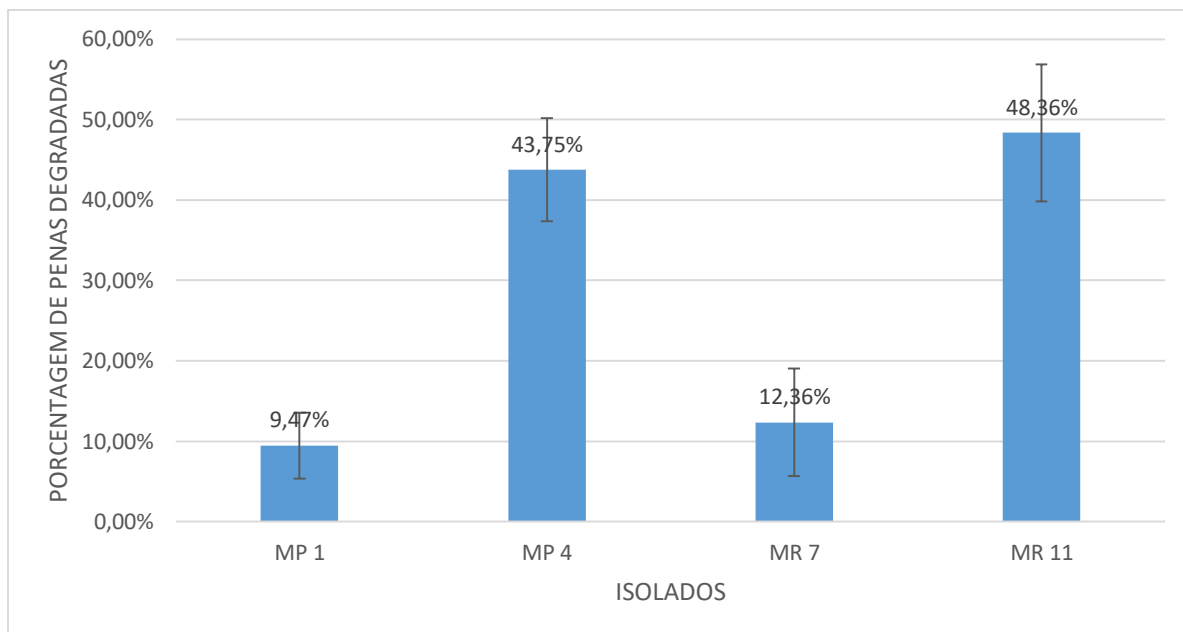


Figura 13- Porcentagens de penas degradadas quando um inóculo padronizado com uma DO de 0,4 foi utilizado para a produção de hidrolisados de penas.

5.7 Seleção dos melhores microrganismos degradadores de penas através da concentração de proteínas presentes no sobrenadante de cultura

O método de Lowry *et al.*, (1951) foi usado para verificar qual dos microrganismos queratinolíticos possui a maior concentração de proteínas nos seus sobrenadantes. No caso de MP 1, a concentração de proteínas no seu sobrenadante foi de 2,472 mg/mL. Para MP 4, a concentração de proteínas foi de 3,475 mg/mL. Já para MR 7, a concentração de proteínas no sobrenadante foi próxima a zero e para MR 11, a concentração de proteínas foi 3,645 mg/mL (figura 15). Com isso, o microrganismo que tendeu a apresentar a maior concentração de proteínas em seu sobrenadante foi MR 11 o que é compatível com o resultado obtido nos experimentos de detecção de atividade queratinolítica.

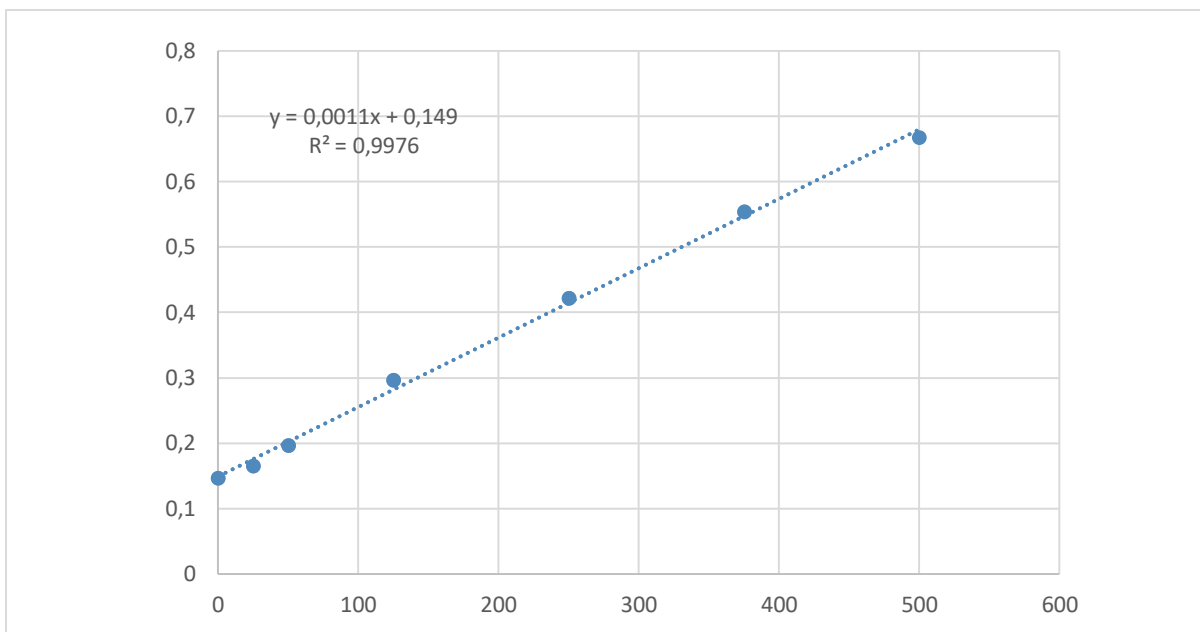


Figura 14 – Curva padrão usada para calcular a concentração de proteínas dos sobrenadantes gerados durante a degradação de penas com padronização do inoculo

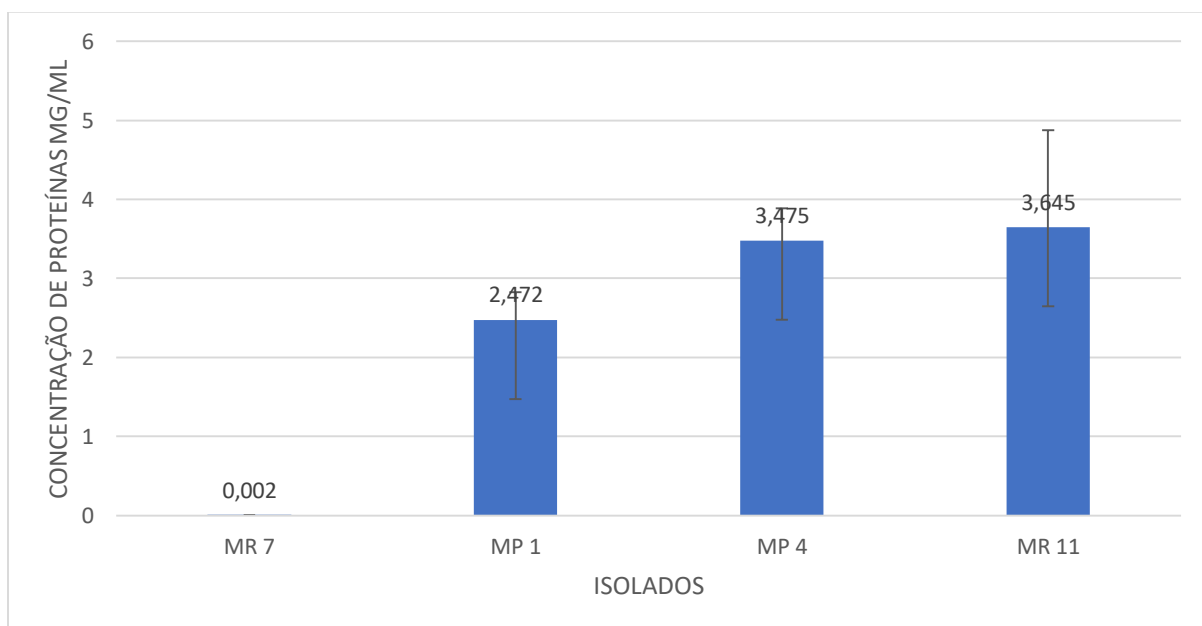


Figura 15 - Concentração de proteínas dos sobrenadantes gerados durante a degradação de penas com padronização do inoculo

6. DISCUSSÃO

A queratina é um substrato que não se acumula na natureza, o que aponta existência de decompositores naturais capazes de degradá-la (Da Rosa, 2020). Neste sentido, os microrganismos que decompõe esse substrato costumam ser coletados do meio ambiente e em diferentes condições ecológicas e ambientais como amostras de solo, ar, folhagem, areia e resíduos ambientais (Anton e Umesh, 2022). Isso é sustentado pelo fato de que a maior parte dos microrganismos com potencial de hidrolisar as penas foram, sobretudo bactérias isoladas a partir do solo e plumagem de aves (Zorro, 2018).

No caso de solos com plantas, a rizosfera é uma região favorável para o crescimento de microrganismos, visto que é uma área do solo afetada pelos compostos secretados pela raiz da planta, como exsudatos orgânicos. Estes últimos estimulam o estabelecimento de uma diversidade de comunidades microbianas e estas participam dos processos de catabolismo da matéria orgânica, mineralização de nutrientes, fixação de nitrogênio e proteção contra pragas e patógenos, o que confere benefícios para o desenvolvimento da planta. Além disso, as substâncias produzidas por cada planta interferem na seleção de microrganismos específicos que irão compor a microbiota da raiz. As pesquisas também apontam a existência de diferenças entre a comunidade microbiana do solo e a comunidade microbiana da rizosfera, pois a primeira costuma apresentar uma diversidade maior e a segunda tende a possuir uma quantidade maior de microrganismos (Romagnoli e Andreote, 2016). Nesse sentido, isso é consistente com os resultados obtidos, uma vez não houve muitas colônias isoladas ou uma grande variedade de espécies e gêneros entre os microrganismos identificados, obtidos a partir do solo do vaso com *Juniperus chinensis*.

Este projeto seguiu passos semelhantes aos relatados na literatura para isolamento de microrganismos queratinolíticos, como o artigo de Li *et al.*, 2021. De acordo com este último, a coleta de microrganismos queratinolíticos deve ser executada por meio das seguintes etapas (figura 16). Primeiramente, amostras ideais para o isolamento desses microrganismos precisam ser retiradas do meio ambiente e elas podem vir de solos ou água com substratos queratinolíticos e as condições ambientais como localização, umidade, clima e a composição da queratina devem ser analisadas. Na segunda etapa, um meio para o crescimento dos microrganismos da amostra e as condições para esse cultivo devem ser escolhidos, baseado no tipo de microrganismos que se deseja isolar. Na terceira etapa, deve ser feito um ensaio que

meça a atividade das proteases geradas pelos microrganismos coletados e, também deve ser averiguado o progresso da decomposição da queratina e a composição das proteínas resultantes da hidrólise dela (Li *et al.*, 2021). Os meios que promovem a síntese de queratinases e secreção de proteínas de maneira eficiente são aqueles ricos em sais e que possuem penas como única fonte de carbono e nitrogênio, visto que os fungos, bactérias e actinomicetos produzem queratinases para a obtenção desses componentes da queratina (Zorro, 2018; Li *et al.*, 2021). Na última etapa, os microrganismos isolados devem ser identificados por métodos seguros e a sequência de aminoácidos das enzimas secretadas deve ser verificada por espectrometria de massa (Li *et al.*, 2021).

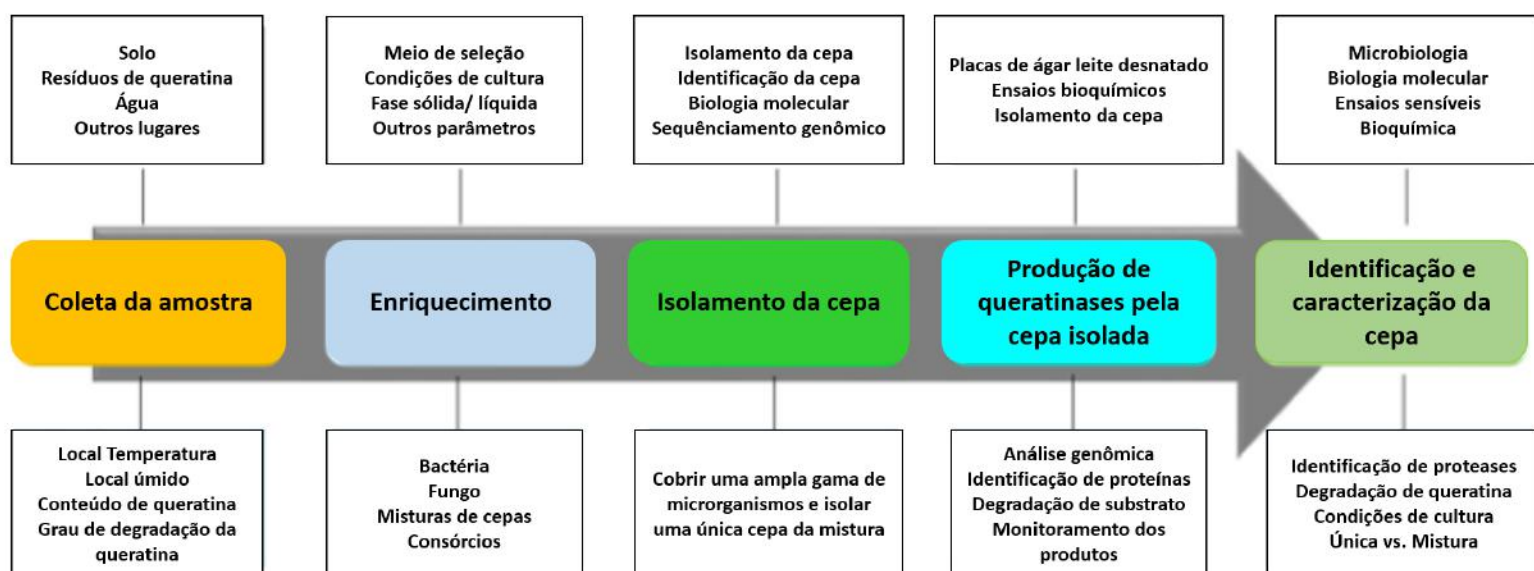


Figura 16 - Esquema de procedimento usado para isolar microrganismos produtores de queratinases (Retirado de Li *et al.*, 2021)

Neste trabalho, a *Pseudomonas aeruginosa* foi uma das bactérias identificadas que mostrou atividade proteolítica e queratinolítica, o que já foi apontado na literatura. Moonnee *et al.*, (2021) isolaram microrganismos de várias amostras de solo. Essas cepas foram inoculadas em placas de ágar caseína e placas de ágar leite desnatado, para a análise de sua atividade proteolítica. Em seguida, os microrganismos que apresentaram esse tipo de atividade foram inoculados em um meio que continha farinha de penas para verificar se eles tinham atividade queratinolítica. Após essa etapa, alguns dos microrganismos conseguiram

formar halos nesses três meios e entre estes havia espécies de *Pseudomonas aeruginosa*. Ademais, uma das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* demonstrou resultados promissores em comparação com trabalhos anteriores disponíveis na literatura. (Moonnee *et al.*, 2021). O artigo de Mohamad *et al.*, (2017) também isolou uma cepa de *Pseudomonas* sp. de uma área que servia para o descarte de penas e sua atividade queratínolítica foi detectada por métodos semelhantes aos do artigo de Moonnee *et al.*, (2021). Essa cepa também foi capaz de produzir queratinases, porém a atividade destas apresentou uma melhora quando novas fontes de nitrogênio e carbono foram postas (Mohamad *et al.*, 2017)

No artigo de Sekar *et al.* (2015), as colônias de microrganismos isolados de um solo com resíduos de penas foram inoculadas em dois meios distintos, o meio ágar contendo farinha de penas e o meio ágar caseína. A formação de halos nesses meios é uma maneira de verificar se esses microrganismos são capazes de degradar as proteínas presentes neles. Inicialmente, os microrganismos foram colocados no meio ágar contendo farinha de penas e aqueles que gerarem halos nesse meio seriam retratados como produtores de queratinases. Em seguida, os microrganismos foram inoculados no meio ágar caseína como modo de confirmar sua atividade proteolítica. Os microrganismos que formaram os maiores halos no meio ágar contendo farinha de penas e que depois, tiveram sua atividade proteolítica também verificada no meio ágar caseína foram do gênero *Bacillus*, especificamente *Bacillus licheniformis*, *B. megaterium*, *B. foraminis*, *B. subtilis* e *B. cereus* (Sekar *et al.*, 2015). Nos experimentos deste trabalho, 9 microrganismos isolados do solo (MP 1, MP 4, MR 4.1, MR 4.2, MR 7, MR 8, MR 10, MR 11 e MR12) possuíam atividade proteolítica, visualizada na formação de halos no ágar caseína, e atividade queratínolítica constatada na hidrólise de penas no meio para a produção de hidrolisados e queratinases. Dos 9, 3 microrganismos (MP 1, MP 4 e MR 11), possivelmente, são do gênero *Bacillus* e destes, 2, provavelmente, são *Bacillus cereus* o que indica resultados parecidos com os do artigo de Sekar *et al.* (2015).

Nagal e Jain (2010) realizaram testes de degradação de penas com bactérias do gênero *Bacillus* isoladas de penas em decomposição e estas eram das espécies *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, e *Bacillus* sp. O inóculo de bactérias (2% v/v) foi preparado a partir do cultivo destas em caldo nutriente por 24 h e foi inoculado em um meio basal com 20 g/L de penas, que ficou sob agitação a 37°C, durante seis dias. Em seguida, foi feita a filtração desse meio com o auxílio de um papel filtro Whatman nº 1 e a quantidade de penas hidrolisadas foi calculada por peso seco. Nesse procedimento, as porcentagens de degradação de penas foram *B. megaterium* (KB008) (68.83 ± 1.3%), *Bacillus*. sp (KB037) (62.04 ±

1.6%), *B. cereus* (KB043) ($78.16 \pm 0.4\%$), *B. licheniformis* (KB059) ($74.39 \pm 2.1\%$), *B. megaterium* (KB069) ($68.86 \pm 1.3\%$), *B. sp* (KB081) ($71.50 \pm 0.3\%$), *Bacillus sp* (KB087) ($61.8 \pm 0.5\%$) e *B. subtilis* KB099 (73.41 ± 0.7). Depois, os sobrenadantes foram analisados em relação concentração de proteína solúvel por método de Lowry e os resultados foram *B. megaterium* (KB008) ($1217.69 \pm 10.8 \mu\text{g/mL}$), *Bacillus sp* (KB037) ($641.15 \pm 24.3 \mu\text{g/mL}$), *B. cereus* (KB043) ($1206.15 \pm 14.7 \mu\text{g/mL}$) *B. licheniformis* (KB059) ($1294.84 \pm 18.7 \mu\text{g/mL}$), *B. megaterium* (KB069) ($1133.84 \pm 16.3 \mu\text{g/mL}$) *Bacillus sp* (KB081) ($1088.46 \pm 22.1 \mu\text{g/mL}$), *Bacillus. sp* (KB087) ($448.8 \pm 15.9 \mu\text{g/mL}$) e *B. subtilis* (KB099) ($995.38 \pm 11.9 \mu\text{g/mL}$) (Nagal e Jain, 2010). Esses resultados foram distintos dos encontrados neste trabalho, pois as porcentagens médias de penas degradadas pelas prováveis espécies de *Bacillus cereus*, MP 1 e MP 4, foram 9,47% e 43,75% o que é menor que a porcentagem de penas hidrolisadas pelos *Bacillus* do referido artigo. Ademais, a concentração de proteínas do sobrenadante de MP 1 e MP 4 foi 2472 $\mu\text{g/mL}$ e 3475 $\mu\text{g/mL}$, concentrações maiores que as dos *Bacillus* do artigo. MR 11, que também é um possível *Bacillus*, apresentou porcentagens de degradação menores que as bactérias desse gênero do artigo e concentrações de proteínas nos sobrenadantes maiores como as cepas MP1 e MP4. Como o principal produto desejado do cultivo são as proteínas solúveis, nossas bactérias aparentam apresentar maior produção, pois quanto mais proteínas solúveis maiores as possibilidades de que estas tenham vindo da degradação de penas. Essas diferenças podem estar relacionadas ao fato de que, apesar de ambas as pesquisas usarem o mesmo volume de meios que possuem penas como única fonte de carbono e nitrogênio, a quantidade de penas colocadas no meio para a produção de hidrolisados e queratinases no nosso trabalho foi maior (0,75g) que a quantidade de penas colocadas no meio basal do artigo (0,5g). Ademais, o tempo em que o processo de hidrólise de penas foi realizado no artigo (6 dias) foi maior que o deste trabalho (5 dias) e o inóculo também não foi padronizado no que se refere a quantidade de microrganismos como ocorreu neste trabalho.

Muitas pesquisas em que houve isolamento de microrganismos queratínolíticos do solo com resíduos de queratina relataram que entre as cepas coletadas, as que apresentaram a melhor atividade queratínolítica eram do gênero *Bacillus sp.* (Leslie *et al.*, 2019) principalmente as espécies *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. cereus* *B. megaterium* e *B. thuringiensis* (Zorro, 2018). As bactérias desse gênero podem gerar endósporos o que permite que sobrevivam ao calor, seca, radiação e produtos químicos (Da Silva, 2021). Esses microrganismos tendem a apresentar uma alta taxa de crescimento e de síntese e liberação de

proteínas para o meio extracelular. Eles também têm uma produção de proteases muito afetada pelas condições proporcionadas pelo habitat onde estão inseridos como: pH, temperatura, tempo de incubação, componentes do meio e a presença de íons metálicos. Desse modo, acredita-se que sua síntese de peptidases extracelulares está muito ligada a uma limitação de nutrientes presentes no meio (Rieger, 2015). Desta forma a otimização do processo de produção de queratinas de penas deve ser performada em etapas futuras.

CONCLUSÃO

Este trabalho apresentou o isolamento de microrganismos queratinolíticos obtidos de amostras de solo e os resultados preliminares para a seleção do melhor microrganismo produtor de queratinas solúveis a partir de penas. De acordo com os experimentos de degradação de penas com o inóculo padronizado, MR11 teve maior porcentagem de hidrólise de penas e apresentou uma concentração maior de proteínas em seu sobrenadante, o que indicaria que ele foi mais bem sucedido nesse processo. Esse experimento ainda não pôde ser feito com todas as bactérias queratinolíticas isoladas e sem os resultados dessas outras bactérias não se pode saber de forma segura se MR 11 é o melhor degradador de penas. Além disso, para averiguar qual microrganismo é o melhor na extração de queratina devem ser realizados testes nos sobrenadantes dos microrganismos como atividade queratinolítica e dosagens de grupos tióis que permitam analisar as enzimas e os mecanismos de catálise envolvidos. Devem ser adicionados experimentos, como LC-MALDI- TOF e SDS-PAGE, para a verificação do tamanho das proteínas resultantes da degradação de penas, uma vez que é necessário haver uma alta proporção de fragmento de aproximadamente 10 KDa, que é a medida compatível com a fiação de proteínas. Também será necessário avaliar a cinética de liberação dessas queratinas pelos microrganismos, para determinar o tempo em que fragmentos de tamanhos desejados estão em maior quantidade no meio. Por outro lado, os resultados iniciais deste trabalho mostraram que as bactérias isoladas possuíam uma boa atividade queratinolítica o que aponta um bom potencial para serem usadas, futuramente, na extração de queratina para a fabricação de fibras têxteis de maneira mais ecológica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIT (2022a). Perfil do Setor. ABIT, São Paulo, 21 mar. 2022. Disponível em: <<https://www.abit.org.br/cont/perfil-do-setor>>. Acesso em: 21 mar. 2022.

ABIT (2022b). Indústria têxtil e de confecção faturou R\$ 194 bilhões em 2021. ABIT, São Paulo, 1 fev. 2022. Disponível em: <<https://www.abit.org.br/noticias/industria-textil-e-de-confeccao-faturou-r-194-bilhoes-em-2021>>. Acesso em: 1 fev. 2022.

ABPA (2020). Gráfico dos setores. ABPA, Rio de Janeiro, 23 set. 2021. Disponível em: <<https://abpa-br.org/mercados/>>. Acesso em: 23 set. 2021

Aguilera, J e Colerato, M (2021). Fios da Moda: Perspectiva Sistêmica Para Circularidade. Modifica, São Paulo, 8 fev. 2022. Disponível em: <<https://reports.modifica.com.br/fios-da-moda/library/downloads/modifica-report-FIBRAS-TEXTEIS-2021.pdf>>. Acesso em: 8 fev. 2022

Anton, D e Umesh, M (2022). Microbial Decomposition of Feather Waste. Research Journal of Biotechnology, 17,1.

AviSite (2021a). USDA: volume de carne de frango dos 5 maiores produtores mundiais cresce menos de 1% em 2021. AviSite, Campinas, 23 set. 2021. Disponível em: <<https://www.avisite.com.br/usda-volume-de-carne-de-frango-dos-5-maiores-produtores-mundiais-cresce-menos-de-1-em-2021/#:~:text=USDA%3A%20volume%20de%20carne%20de,de%201%25%20em%202021%20%2D%20AviSite>>. Acesso em: 23 set. 2021.

AviSite (2021b). Carne de frango, bovina e suína: as previsões do MAPA para 2031. AviSite, Campinas, 23 set. 2021. Disponível em: <<https://www.beefpoint.com.br/carne-de-frango-bovina-e-suina-as-previsoes-do-mapa-para-2031/#:~:text=Pelas%20proje%C3%A7%C3%B5es%20do%20MAPA%2C%20em,superior%20ao%20estimado%20para%202021.>>. Acesso em: 23 set. 2021.

Barros, S. (2021). Otimização do processo de tingimento de Fibras Naturais e Sintéticas utilizando Líquidos Iônicos Próticos. Tese de Doutorado. Universidade Federal da Bahia (UFBA), Bahia, 193f.

Berlin, L. (2014) A Indústria têxtil brasileira e suas adequações na implementação do desenvolvimento. Sustentável. Moda Palavra. v. 7, pp 15-45.

Bittencourt, M.L. (2014). Avaliação do perfil de proteases expressas por *Penicillium fellutanum* e *Penicillium restrictum* isolados do solo do cerrado brasileiro. Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília, Distrito Federal, 79f.

Bohac, J., & Kornilowicz-Kowalska, T. (2019). Fungal diversity and keratinolytic activity of fungi from lignocellulosic composts with chicken feathers. *Process Biochemistry*. doi:10.1016.

Călin, M., Constantinescu-Aruxandei, D., Alexandrescu, E., Răut, I., Doni, M. B., Arsene, M.-L., Lazăr, V. (2017). Degradation of keratin substrates by keratinolytic fungi. *Electronic Journal of Biotechnology*, 28, 101–112.

Chilakamarry, C. R., Mahmood, S., Saffe, S. N. B. M., Arifin, M. A. B., Gupta, A., Sikkandar, M. Y e Narasaiah, B. (2021). Extraction and application of keratin from natural resources: a review. *3 Biotech*, 11(5).

Cortezi, M (2009). Isolamento de Microrganismos Produtores de Queratinase: Estudo da Biodegradação da Queratina Oriunda de Penas de Abatedouro de Frangos. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista (Unesp), São Paulo, 138 f.

CropLife Brasil (CLB) (2020). A versatilidade das fibras naturais. CropLife Brasil. São Paulo. 7 fev. 2022. Disponível em: <<https://croplifebrasil.org/noticias/a-versatilidade-das-fibras-naturais/>>. Acesso em: 7 fev.2022.

Da Motta, J. (2021). A incorporação dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável em empresas gaúchas de moda. Dissertação (Mestrado em Acadêmico em Administração). Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Rio Grande do Sul, 78f.

Da Rosa, C (2020). Produção de peptídeos antimicrobianos por *Bacillus* sp. P45 em subprodutos da indústria avícola. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e Meio Ambiente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rio Grande do sul, 91f.

Da Silva, I (2021). Potencial biotecnológico de espécies de gêneros *Streptomyces* e *Bacillus* isolados dos rios de Madeira e Purus para aplicação agrícola. Dissertação de mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Amazonas, 78f.

De Ecoa, J (2021). Devemos abolir peças de roupa sintéticas para proteger o meio ambiente? Uol. São Paulo. 13 fev. 2022. Disponível em: <<https://www.uol.com.br/ecoa/ultimas-noticias/2021/07/01/devemos-abolir-pecas-de-roupa-sinteticas-para-protger-o-meio-ambiente.htm#:~:text=Fibras%20naturais%20tamb%C3%A9m%20geram%20impacto&text=Segundo%20o%20relat%C3%B3rio%20Fios%20da,de%20pesticidas%20utilizado%20no%20Brasil.>>. Acesso em: 13 fev. 2022.

De Menezes, C. L. A., Santos, R. do C., Santos, M. V., Boscolo, M., da Silva, R., Gomes, E., & da Silva, R. R. (2021). Industrial sustainability of microbial keratinases: production and potential applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(5).

De Rossi, F. E. (2019). Os principais problemas relacionados ao comércio internacional do setor têxtil brasileiro. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Caxias do Sul (UCS), Rio Grande do Sul, 87f.

De Zen, S., Iguma, M., Ortelan, C., dos Santos, V e Felli, C (2014) Evolução da Avicultura no Brasil. Informativo CEPEA. Edição 1, São Paulo, pp 1-4.

Duarte, T (2009). Produção de queratinases por estirpes multagenizadas de *Candida parapsilosis*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, 98f.

Duffeck, C (2020). Prospecção de queratinases microbianas: produção e caracterização bioquímica funcional. Dissertação de mestrado em microbiologia. Universidade Estadual Paulista (Unesp), São Paulo, 57f.

Durocher, Y. (2020) Circular Economy And The Textile Industry. Forbes, Nova Iorque, 2 ago. 2021. Disponível em: <<https://www.forbes.com/sites/forbesagencycouncil/2020/12/01/circular-economy-and-the-textile-industry/?sh=425a048657a9>>. Acesso em: 2 ago. 2021.

Garcia, C.E.R., Youssef, E.Y., Vecchia, F.D., Pinheiro, J.W e Shimokomaki, M (2003). Agregando valor a avicultura de postura. Anuário 2002 da Avicultura Industrial. Edição 1096, São Paulo.

Gupta, A., Kamarudin, N.B., Yeo, C., Chua, G. K., Bin, R (2012). Extraction of Keratin Protein from Chicken Feather. J. Chem. Chem. Eng. 6,732-737.

He, M., Zhang, B., Dou, Y., Yin, G., Cui, Y e Chen X (2017) Fabrication and characterization of electrospun feather keratin/poly (vinyl alcohol) composite nanofibers. RSC Advances, 7, 9854–9861.

Koszevska, M. (2018). Circular Economy — Challenges for the Textile and Clothing Industry. Autex Research Journal, 18(4), 337–347.

Leslie, S., Jong, N., Henriette, A., Nicolas, N e Leopold, T (2019). Isolation and characterization of a novel keratinolytic bacterial strain from soil samples of chicken feather keratinaceous-waste dumping sites of Ngaoundere (Cameroon). African Journal of Biotechnology, 20,4.

Li, Q (2021). Structure, Application, and Biochemistry of Microbial Keratinases. Front. Microbiol. 12:674345.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 193: 267 – 275.

Matos, F., da Silva, N., da Costa, B., Porto, A e Melo Oliveira, V (2021). Agroindústria integrada a avicultura: mini- revisão focada na sustentabilidade. Resumo. In: Congresso Internacional da Agroindústria (CIAGRO), online. p 16.

Mauricio, L.P (2019). Caracterização da integridade estrutural da fibra capilar tratada com diferentes produtos químicos. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Rio Grande do Norte, 109f.

Mazotto, A.M., Couri, S., Damaso, M e Vermelho, A.B (2013). Degradation of feather waste by *Aspergillus niger* keratinases: Comparison of submerged and solid-state fermentation. *International Biodeterioration & Biodegradation* 85, 189 – 195.

Mohamad, N., Phang, L., & Abd-Aziz, S. (2017). Optimization of metallo-keratinase production by *Pseudomonas* sp. LM19 as a potential enzyme for feather waste conversion. *Biocatalysis and Biotransformation*, 35(1), 41–50.

Moonnee, Y., Foysal, M., Hashem, A e Miah, M (2021). Keratinolytic protease from *Pseudomonas aeruginosa* for leather skin processing. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 19, 53.

Muthu, S. S, (2017). Introduction. In: Sustainability in the Textile Industry. Muthu, S. S, eds. (Nova Iorque: Springer), pp 1-9.

Nagal, S e Jain, P.C (2010). Feather degradation by strains of *Bacillus* isolated from decomposing feathers. *Brazilian Journal of Microbiology*, pp 196-200.

Nature Climate Change (2018). The price of fast fashion. *Nature Climate Change*. Londres, Inglaterra. 13 fev. 2022. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41558-017-0058-9>>. Acesso em: 13 fev. 2022.

Nature Climate Change Editorial (2018) The price of fast fashion. *Nature Climate Change*, Londres, 23 set. 2021. Disponível em <<https://www.nature.com/articles/s41558-017-0058-9>> Acesso em: 23 set. 2021.

O Globo (2021). Algodão brasileiro consome menos água, mas uso de agrotóxicos preocupa, indica relatório. *O Globo*. Rio de Janeiro. 11 fev. 2022. Disponível em: <[Perța-Crișan, S., Ursachi, C. Ștefan, Gavrița, S., Oancea, F., & Munteanu, F.-D. \(2021\). Closing the Loop with Keratin-Rich Fibrous Materials. *Polymers*, 13\(11\), 1896.](https://revistagloborural.globo.com/Noticias/Agricultura/Algodao/noticia/2021/04/algodao-brasileiro-consome-menos-agua-mas-uso-de-agrotoxicos-preocupa-indica-relatorio.html#:~:text=O%20consumo%20m%C3%A9dio%20nessa%20produ%C3%A7%C3%A3o,por%20quil%C3%B3metro%20de%20fibra%20produzida.>. Acesso em: 11 fev. 2022.</p></div><div data-bbox=)

Prasanthi, N., Bhargavi, S e Machiraju, P.V.S (2016) Chicken Feather Waste – A Threat to the Environment. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*. v. 5, pp. 16759-16764.

Provin, A. P., Cubas, A e Dutra, A.R (2020). Alternativas de materiais e processos mais sustentáveis para a indústria têxtil atual — uma revisão. *Moda Palavra*. v. 14, pp. 122–149.

Pulidori, E., Micalizzi, S., Bramanti, E., Bernazzani, L., Duce, C., De Maria, C., Montemurro, F., Pelosi, C., De Acutis, A., Vozzi, G e Tinè, M.R (2021). *International Journal of Molecular Science*. 22, 9597.

Qiu, J., Wilkens, C., Barrett, K., & Meyer, A. S. (2020). Microbial enzymes catalyzing keratin degradation: Classification, structure, function. *Biotechnology Advances*, 44, 107607.

Rieger, T (2015). Degradação de penas por *Bacillus* sp. CL18: propriedades da protease bruta produzida durante cultivos submersos. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Rio Grande do Sul, 56f.

Rigo, D., Gayeski, L., Tres, G., Camera, F e Zeni, J (2021). Produção Microbiológica de Enzimas: uma Revisão. *Brazilian Journal of Development* v.7, n.1, pp.9232-9254.

Romagnoli, E e Andreote, F (2016). Rizoosfera. In: *Microbiologia do solo*. Cardoso, E e Andreote, F, eds. 2. ed. (Piracicaba: ESALQ), pp 47-60.

Ross, S. (2016) Advancing life cycle assessment of textile products to include textile chemicals. Tese de doutorado (Tese para o grau de médico em filosofia) - Department of energy and environment, Chalmers University of Technology, Gothenburg, Sweden, 82 f.

Šafarič, R., Fras Zemljič, L., Novak, M., Dugonik, B., Bratina, B., Gubeljak, N., ... Strnad, S. (2020). Preparation and Characterisation of Waste Poultry Feathers Composite Fibreboards. *Materials*, 13(21), 4964.

SAICM (2021). Strategic Approach to International Chemicals Management. Engaging the textile industry as a key sector in SAICM: A review of PFAS as a chemical class in the textile sector. Organização das Nações Unidas (ONU), Nova Iorque, 61f.

Santha Kalaikumari, S., Vennila, T., Monika, V., Chandra Raj, K., Gunasekaran, P., & Rajendhran, J. (2019). Bioutilization of poultry feather for keratinase production and its application in leather industry. *Journal of Cleaner Production* 208, 44-53.

Schmitt, J e Folle, L.F (2020). Análise do conforto termo fisiológico e da resistência à tração em tecido tramado com algodão reciclado e filamentos obtidos da reciclagem de resíduos pós-consumo de garrafas pet. *Revista Matéria*, v.26, n.1.

Sekar, V., Kannan, M., Ganesan, R., Dheeba, B., Sivakumar, N., & Kannan, K. (2015). Isolation and Screening of Keratinolytic Bacteria from Feather Dumping Soil in and Around Cuddalore and Villupuram, Tamil Nadu. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 86(3), 567–575.

SENAR (2019). Serviço Nacional de Aprendizagem Rural. Irrigação: gestão de sistemas por superfície. Brasília, 52p.

Sharma, S e Gupta, A (2016). Sustainable Management of Keratin Waste Biomass: Applications and Future Perspectives. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 59:1-14.

Sypka M, Jodłowska I, Białkowska AM. Keratinases as Versatile Enzymatic Tools for Sustainable Development. *Biomolecules*. 2021; 11(12):1900.

Suparna, M e Rinsey Antony, V (2016) Eco friendly Textiles. *International Journal of Science Technology and Management* pp 67-73.

Tesfaye, T., Sitholea, B e Ramjugernath, D. (2018) Valorisation of chicken feather barbs: Utilisation in yarn production and technical textile applications. *Sustainable Chemistry and Pharmacy* 8,38-49.

The Sustainable Business Group (2015) The state of the apparel sector. Special Report, Water. Disponível em: <http://glasaaward.org/wp-content/uploads/2015/05/GLASA_2015_StateofApparelSector_SpecialReport_Water_150624.pdf>. Acessado em: 23 set. 2021.

Tiquia, S.M., Ichida, J.M., Keener, H.M., Elwell, D.L., Burt, Jr. EH e Michel Jr F.C (2005). Bacterial community profiles on feathers during composting as determined by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of 16S rDNA genes. *Applied Microbiology Biotechnology*, 67, 412–419.

Xu, H. Regenerated keratin fibers from chicken feathers from textile and biomedical applications. (2013). 103f. Dissertação de Mestrado- University of Nebraska, Lincoln, Nebraska, 103f.

Zanon, S. (2021). Relatório analisa impacto socioambiental de fibras na indústria da moda. Uol, São Paulo, 4 fev. 2022. Disponível em: <<https://www.uol.com.br/ecoa/colunas/noticias-da-floresta/2021/04/22/relatorio-analisa-impacto-socioambiental-de-fibras-na-industria-da-moda.htm>>. Acesso em: 4 fev. 2022.

Zorro, P (2018). Evaluación de diferentes cepas queratinolíticas en la hidrólisis de plumas de pollo. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia do Alimentos. Universidad Nacional de Colombia (UNAL), Bogotá, Colombia, 65f.