

## EXTRACCIÓN DE LA QUERATINA DE LA LANA DE OVEJA "LATXA"

**Borja Fernández-d'Arlas, Cristina Peña-Rodríguez, Arantxa Eceiza\***

Grupo "Materiales+Tecnologías" (GMT), Departamento de Ingeniería Química y del Medio Ambiente. Universidad del País Vasco (UPV/EHU), Pza. Europa 1, 20018 Donostia-San Sebastián, España. Correo electrónico: [arantxa.eceiza@ehu.eus](mailto:arantxa.eceiza@ehu.eus)

*Recibido: Septiembre 2015; Aceptado:*

### RESUMEN

Este trabajo presenta el estudio de la extracción de la queratina de la lana de la raza ovina *Latxa* (*Ovis aries*), autóctona de *Navarra* y *País Vasco*, norte de España. Como consecuencia de su elevado diámetro ( $> 100 \mu\text{m}$ ), la lana de esta especie presenta reducidas posibilidades de aprovechamiento en la industria textil. La extracción se ha llevado a cabo mediante un proceso extractivo con ácido tioglicólico en medio básico. La variación de la morfología de las fibras de lana durante el tratamiento se ha estudiado mediante microscopía óptica. Las dispersiones de queratina obtenidas se han caracterizado para determinar las propiedades físico-químicas en medio acuoso mediante dispersión estática de luz y calorimetría diferencial de barrido (DSC). Se han preparado films a partir de las dispersiones de queratina, que han sido caracterizadas tanto mediante espectroscopia infrarroja de transformada de *Fourier* como mediante DSC.

**Palabras claves:** Queratina, Oveja *Latxa*, Extracción, Caracterización

### ABSTRACT

This work presents the study of the extraction of the keratin from the wool of *Latxa* sheep (*Ovis aries*), original from *Navarra* and *Basque Country*, northern *Spain*, and which wool has little textile worth. The extraction has been carried out through an extractive process using thioglycolic acid in basic media. The obtained keratin aqueous solutions have been characterized to determine the physico-chemical properties of keratin in aqueous media. The morphology of wool fibers through the extraction has been monitored by optical microscopy. The keratin in aqueous media has been characterized through static light scattering and differential scanning calorimetry (DSC). Films of keratin were prepared, which has been characterized through *Fourier* transform infrared spectroscopy and DSC.

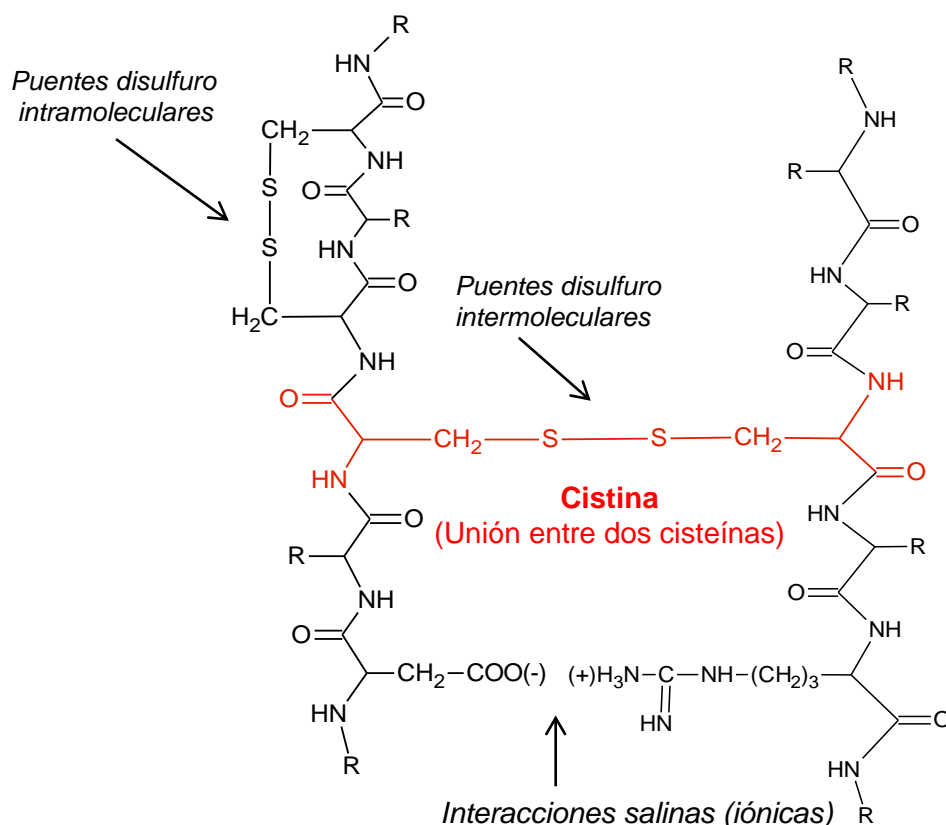
**Key words:** Keratine, *Latxa* Sheep, Extraction, Characterization

## INTRODUCCIÓN

La raza ovina *Latxa* es originaria de *Navarra* y *País Vasco*, y su explotación está orientada a la producción de queso de tipo Idiazábal o de pastor, de tipo *Artzai Gazta* [1]. Las posibilidades de aprovechamiento de su lana son limitadas en la industria textil debido al elevado diámetro de las fibras ( $> 100 \mu\text{m}$ ). De hecho la palabra «*Latxa*» proviene del euskera y significa «basto, rudo, áspero», refiriéndose a la aspereza de la lana de esta raza [2]. Es por ello que la lana se considera un residuo agroindustrial para los ganaderos debido a su difícil tratamiento y valorización. El desarrollo de productos derivados de esta lana en diversas aplicaciones industriales supondría una fuente de ingresos adicional para esta actividad económica.

El componente principal de la lana es la queratina (del griego *κερατίνη*, córnea o de cuerno) [3], proteína fibrilar (o fibroína) resultante de la polimerización de una veintena de aminoácidos y con alto contenido de azufre, presente en los aminoácidos de cisteína que dan lugar a cistinas (puentes disulfuro,  $R_1-S-S-R_2$ , entre aminoácidos de cisteína) y que forman puentes intra e intermoleculares

en y entre cadenas fibrilares dificultando su solubilización (Esquema 1) [4]. Las queratinas también están presentes en el pelo, uñas, piel o plumas de aves [5,6], y pueden emplearse en el desarrollo de bioplásticos, en nanopartículas proteicas para encapsulación, transporte y liberación de fármacos u otras aplicaciones biomédicas como el desarrollo de andamios o tejidos para la regeneración celular [7,8].



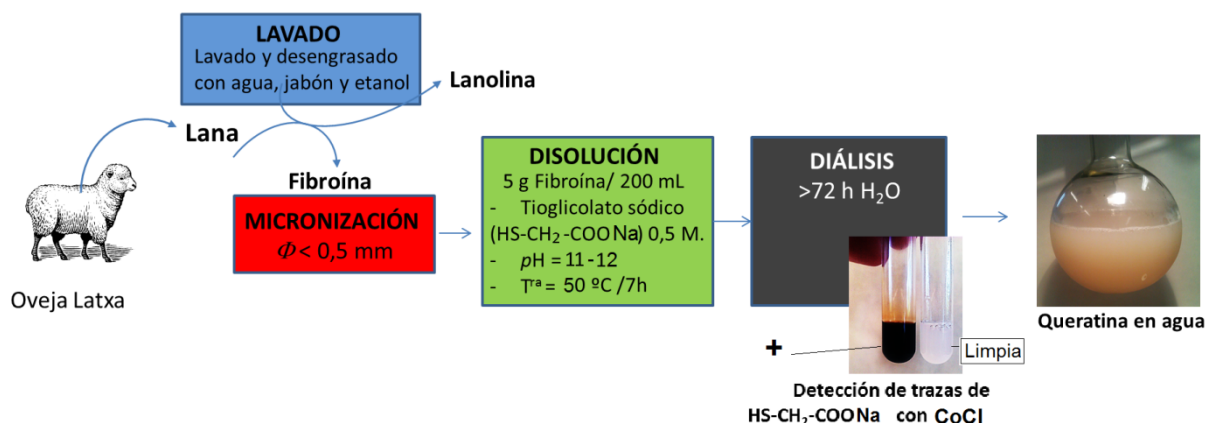
Esquema 1. Estructura general de la queratina indicando algunas de sus interacciones inter e intramoleculares.

En este trabajo, se ha extraído la queratina de la raza ovina *Latxa* empleando el método descrito por *Goddard* [9,10], que consiste en tratar la lana (exenta de lanolina) en medio acuoso alcalino empleando tioles tales como el tioglicolato de sodio (HSCH<sub>2</sub>COONa), valiéndose de la labilidad del grupo -S-S- y de la capacidad de intercambio entre sulfuros ( $R-S_1-S_2-R + R-S_3-S_4-R \leftrightarrow R-S_1-S_3-R + R-S_2-S_4-R$ ).

## PARTE EXPERIMENTAL

**Extracción de queratina.** La lana utilizada ha sido la de una oveja de 2 años recién esquilada. La lana ha sido lavada primeramente con agua y jabón para la eliminación de la lanolina y posteriormente enjuagada y aclarada con agua y etanol, tras lo cual se ha secado a vacío. Posteriormente la lana ha sido micronizada en un molino con un tamiz de 0,5 mm. Se han utilizado

dos protocolos de extracción. En el primero se han pesado 5 g de lana micronizada y dispersado en 200 mL de una disolución 0,5 M de ácido tioglicólico ( $\text{HS-CH}_2\text{-COOH}$ ) NaOH pH = ~ 12. La temperatura de la suspensión se ha elevado hasta 50°C y se ha agitado durante 7 horas mediante agitación magnética, tras lo cual se ha observado la presencia de dos fases; una fase dispersa homogénea y un residuo. El residuo de lana no dispersado ha sido separado mediante filtración con papel de filtro de peso conocido, que posteriormente ha sido secado para determinar el rendimiento de extracción. El protocolo se describe en el Esquema 2. La purificación de la dispersión obtenida se ha llevado a cabo mediante un proceso de diálisis. Para ello, las dispersiones obtenidas se han introducido en membranas de diálisis (*Spectra*/Por 2, ref. 132680) de corte molecular entre 12.000–14.000  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , y sumergido posteriormente en un tanque de agua destilada con renovación de agua constante. La purificación se ha prolongado hasta la no detección de trazas de tioglicolato sódico ( $\text{HS-CH}_2\text{-COONa}$ ), tanto en el agua como en la dispersión de queratina resultante. Para ello se ha realizado un análisis colorimétrico de complejación con cobalto. En presencia de trazas de tioglicolato la disolución se torna de color marronácea (Esquema 2) debido a la formación del complejo cobalto–tioglicolato. De esta manera se han obtenido concentraciones en el rango de 3,3–4,0  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , tal y como ha sido determinado por diferencia de pesada tras la evaporación del agua.



Esquema 2. Proceso seguido para la extracción de la queratina en medio acuoso indicando las condiciones en cada uno de los pasos y la prueba cualitativa realizada para la detección de trazas de tioglicolato de sodio mediante la complejación con cobalto.

El segundo protocolo de extracción se ha realizado a mayor temperatura y menor pH. Concretamente, se han pesado 5 g de lana micronizada y se han dispersado en 200 mL de una disolución de 0,5 M de  $\text{HS-CH}_2\text{-COOH}$  NaOH pH ~ 10. La dispersión obtenida se ha mantenido a 100°C durante 7 horas con agitación magnética. La purificación se ha realizado siguiendo los pasos descritos en el protocolo anterior.

**Preparación de films de queratina.** Se han preparado films de queratina con diferente contenido de glicerol (0, 38 y 86% en masa de glicerol) a partir de 80 mL de disolución de queratina ( $4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Las películas han sido preparadas mediante *casting*, vaciando las mezclas en moldes de poli(tetrafluoroetileno). La eliminación del agua se ha realizado a  $30^\circ\text{C}$  y presión de  $200 \pm 80$  mbar durante  $\sim 72$  horas.

### Caracterización de las disoluciones y films de queratina

**Microscopía óptica.** La caracterización morfológica de las fibras ha sido llevada a cabo empleando un microscopio óptico *Nikon-Eclipse 80i* en modo transmisión, colocando las fibras sometidas a distintos tratamientos sobre porta-muestras de vidrio.

**Dispersión de luz estática.** Se ha empleado un equipo *Brookhaven BI9000AT* con el detector instalado sobre un goniómetro. La masa molecular promedio en peso,  $M_w$ , de la queratina extraída ha sido determinada mediante el método de *Zimm* [15]. Se han preparado disoluciones acuosas de queratina con concentraciones en el intervalo  $0,1\text{--}0,4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  a partir de la disolución de queratina extraída. Las muestras han sido filtradas a través de membranas de nailon de  $0,45 \mu\text{m}$  de poro. Se ha analizado la intensidad de luz dispersada en un intervalo de ángulos de  $35\text{--}100^\circ$ . La intensidad detectada ha sido de 4,7 Mcps para la muestra más concentrada a  $40^\circ$  y 24,4 Kcps a  $90^\circ$ . Se ha empleado un obturador de haz de 1 mm de diámetro, una duración de adquisición de fotones de 0,2 s y 10 repeticiones por ángulo. La variación del índice de refracción de la lana con la concentración ( $dn/dc$ ) ha sido determinado mediante refractometría diferencial empleando disoluciones acuosas en el rango de  $0,75\text{--}3,00 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Se ha obtenido un valor  $dn/dc = 0,161 \pm 0,006 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ . El calibrado del refractómetro se ha realizado con distintas disoluciones acuosas de KCl.

**Espectroscopia infrarroja.** Las disoluciones de queratina han sido depositadas sobre pastillas de KBr dejando evaporar el agua en campana de vacío hasta masa constante. La película de queratina sólida así formada ha sido analizada mediante espectroscopia infrarroja en el intervalo de  $4.000\text{--}400 \text{ cm}^{-1}$ , con una resolución de  $2 \text{ cm}^{-1}$  y 20 acumulaciones. El equipo empleado ha sido un *Nikolet-Nexus*.

**Calorimetría diferencial de barrido.** Las películas de queratina y queratina/glicerol se han analizado mediante calorimetría diferencial de barrido en el intervalo de  $-70\text{--}200^\circ\text{C}$  a  $20^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  en un equipo *Mettler Toledo DSC822*.

**Desnaturalización térmica.** Los estudios del proceso de desnaturalización térmica de la queratina han sido llevados a cabo depositando una gota de la dispersión acuosa de queratina obtenida tras la diálisis sobre una cápsula de calorimetría diferencial de barrido y se ha analizado en el intervalo de  $15\text{--}80^\circ\text{C}$  a una velocidad de calentamiento de  $20^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Extracción de la queratina.** Para extraer la queratina de la fibra de lana se han utilizado dos protocolos que difieren en el pH y temperatura empleada, resultando en diferentes rendimientos. Así a  $\text{pH} = 12$  y  $T = 50^\circ\text{C}$ , se ha obtenido un rendimiento mucho mayor, del 51%, y disoluciones acuosas de  $3,3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . El rendimiento de extracción es solo ligeramente inferior a los obtenidos por otros autores mediante la combinación de diversos agentes tales como urea, tiourea o mercaptoetanol para la extracción de la queratina de pelo humano [11]. Mediante el segundo protocolo, a  $\text{pH} = 10$  y  $T = 100^\circ\text{C}$ , el rendimiento ha sido únicamente del 4%. Este resultado puede ser atribuido a varios factores. A valores de pH altos la hidrólisis de los grupos amida está más favorecida lo cual puede ayudar a la disolución de algunas cadenas y a la mayor penetración del glicolato. Por otra parte, tal y como se ha visto en este trabajo, la solubilidad de la queratina en agua disminuye a temperaturas mayores a  $50^\circ\text{C}$ , lo cual es atribuido a un aumento de interacciones intermoleculares en el seno de la queratina.

Cabe mencionar que el protocolo seguido ha dado rendimientos de extracción muy superiores a los obtenidos mediante el empleo de únicamente disoluciones acuosas concentradas ( $\approx 10 \text{ M}$ ) de una sal caotrópica como el nitrato de calcio,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . Además, se ha determinado que esta misma disolución es, sin embargo, capaz de disolver completamente la fibroína de la seda de gusano, de manera análoga a otras sales con efecto caotrópico sobre las sedas. La diferencia con la queratina puede atribuirse a la mayor proporción de cisteínas y cistinas en las queratinas de las lanas que impiden el efecto de solvatación caotrópico debido a las uniones intermoleculares de naturaleza covalente.

La acción del tioglicolato sobre la queratina se representa en la Figura 1. Según el proceso aceptado en la literatura [9] se da un intercambio en el grupo disulfuro ( $-\text{S}-\text{S}-$ ) debido a su labilidad. Al ser intercambiado por un tiol con un grupo cargado negativamente en el extremo a lo

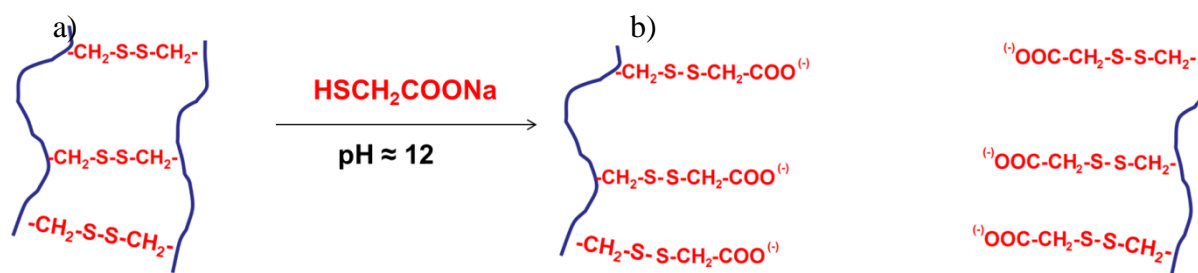


Figura 1. Reducción de las cistinas mediante la acción del tioglicolato de sodio, y la repulsión macromolecular debido a la ionización del grupo ácido en medio básico. a) Queratina natural con uniones cistina y b) macromoléculas separadas tras la acción del glicolato

largo de la cadena macromolecular, la repulsión electrostática entre los tioglicolatos favorece su separación y solvatación por moléculas de agua. De este modo, se ha observado que la adición de ácido clorhídrico diluido hasta  $\text{pH} = 3\text{--}4$  da lugar a la precipitación de la queratina acuosa obtenida mediante este protocolo. Esto puede estar vinculado con la protonación de los grupos ácidos del glicolato y la disminución de la repulsión intermolecular, favoreciéndose las interacciones intermoleculares y así su precipitación.

La morfología de las fibras de lana con el tratamiento de extracción ha sido monitorizada mediante microscopía óptica. En la Figura 2 se recogen imágenes de las fibras tratadas con glicolato a  $50^\circ\text{C}$  y tomadas a distintos tiempos de tratamiento. Las imágenes de las fibras iniciales parecen indicar que éstas son huecas. Con la exposición al glicolato la oquedad desaparece progresivamente con el tiempo. Esto puede ser atribuido a fracciones de queratina disueltas con el tratamiento que van ocupando el hueco interior de la fibra. De hecho varios autores afirman que debido a la presencia de ácidos grasos unidos covalentemente a la superficie de la lana su carácter hidrofóbico minimiza el ataque químico superficial en medios acuosos [12]. Además, diversos autores afirman que las capas exteriores de la cutícula presentan mayor proporción de cistinas y mayor entrecruzamiento químico, por lo cual se favorece que el ataque químico sea más susceptible en capas internas [12,13].

Por otra parte, se puede apreciar que la superficie se modifica formándose una estructura escamada lo cual puede ser consecuencia de una decapación parcial de las cutículas con el tratamiento. Nakamura y col. han observado una evolución morfológica muy similar durante la extracción de la queratina de pelo humano [11].

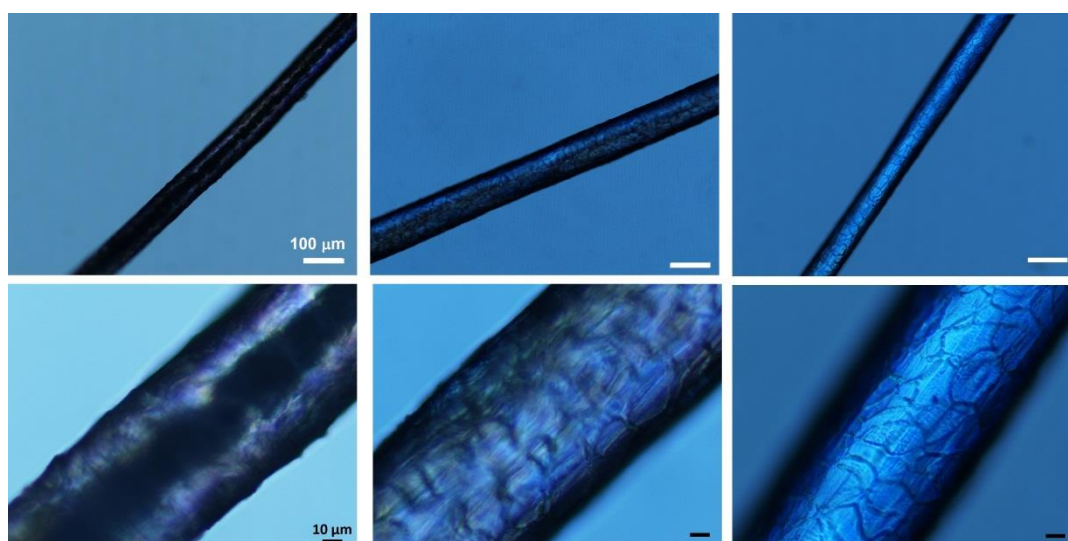


Figura 2. Evolución morfológica de las fibras de la lana de oveja *Latxa* con el tratamiento con tioglicolato. a–b) a tiempo inicial, c–d) después de 1 minuto, y e–f) después de 2 horas, a  $50^\circ\text{C}$ . Las escalas de las imágenes de la fila superior e inferior son de 100 y 10  $\mu\text{m}$ , respectivamente.



**Dispersión de luz estática.** Las dispersiones de queratina se han analizado mediante dispersión de luz estática. Como paso previo a las medidas de intensidad dispersada se ha determinado la variación del índice de refracción o *incremento específico del índice de refracción*,  $dn/dc$ , necesario para estimar la constante de dispersión  $K$ , que engloba las características ópticas del sistema. El valor obtenido mediante refractometría diferencial ha sido de  $dn/dc = 0,161 \pm 0,006 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ . La Figura 3a muestra los datos de  $\Delta n$  frente a la concentración de queratina de cuyo ajuste lineal se ha determinado  $dn/dc$ . Para determinar la masa molecular de la queratina se ha considerado que el tamaño promedio de las partículas de queratina disuelta debería ser no muy inferior al de la longitud de onda de la luz empleada ( $\lambda = 637 \text{ nm}$ ), ya que suponemos que el radio de giro es  $R_g > \lambda/20$  al tratarse de una biomacromolécula, normalmente con altas masas moleculares. Por ello se ha considerado la dependencia de la intensidad dispersada con el ángulo para considerar la disimetría angular generada al interactuar la luz con los bordes de las partículas y se ha descartado el modelo simple de *Debye* [14]. Se ha elegido el modelo de *Zimm* [15] para, mediante los valores de intensidad a distintos ángulos, determinar simultáneamente la masa molecular promedio en peso,  $M_w$ , el radio de giro,  $R_g$ , y el segundo coeficiente del virial,  $A_2$ . El modelo generalizado que relaciona la intensidad dispersada en función del ángulo,  $\theta$ , y la concentración de queratina,  $c$ , es:

$$\frac{K \cdot c}{R_\theta} = \left( \frac{1}{M_w} + 2A_2c + \dots \right) \cdot \left[ 1 + \frac{16\pi^2}{3\lambda^2} R_g^2 \sin^2(\theta/2) \right] \quad (1)$$

donde  $R_\theta$  es el ratio de *Rayleigh*, proporcional a la intensidad,  $K$  es la constante óptica y  $M_w$  la masa molecular promedio en peso. La Figura 3b muestra los valores de  $Kc/R_\theta$  frente a  $\sin^2(\theta/2) + b \cdot c$ , donde  $b$  es un constante arbitraria que en este caso es 25.800. A partir de los datos de la Figura 3b y mediante las sucesivas extrapolaciones a  $\theta \rightarrow 0$  y a  $c \rightarrow 0$  se han obtenido los valores de  $R_g$  y  $A_2$ , respectivamente, a la vez que  $M_w$ . Los valores obtenidos para la queratina extraída a 50°C se muestran en la Tabla 1. El alto valor de  $M_w$  sugiere un alto grado de polimerización de los aminoácidos constituyentes de la lana. Estos valores contrastan con los obtenidos por otros autores para queratinas humanas extraídas mediante el método *Shindai* [11], empleando urea y tiourea como

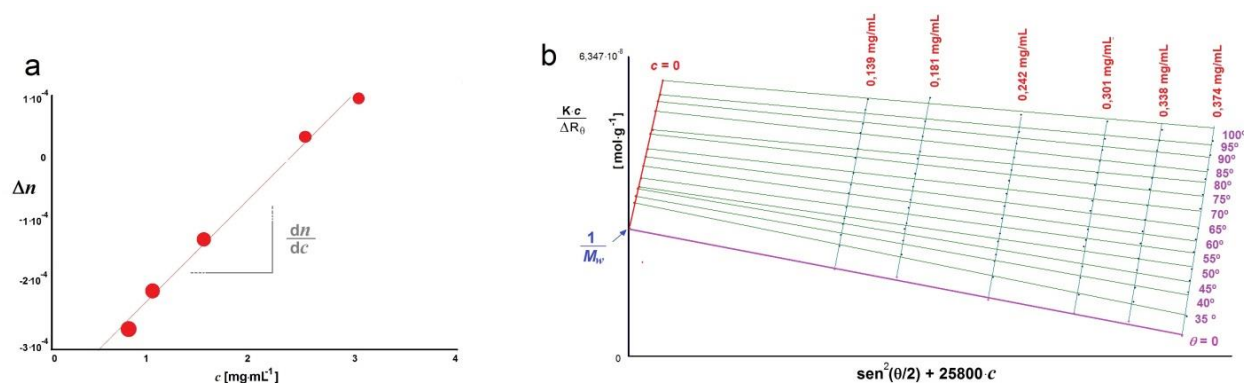


Figura 3. Caracterización macromolecular de la queratina. a) Variación del índice de refracción con la concentración de las disoluciones acuosas de la queratina de oveja *Latxa*, b) Diagrama de Zimm, de la intensidad dispersada a distintos ángulos por disoluciones de distinta concentración.

Tabla1. Resultados de la caracterización de las disoluciones acuosas mediante dispersión de luz.

$\theta \rightarrow 0$	$M_w$	$(3,67 \pm 0,05) \cdot 10^7 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$
	$R_g$	$91,7 \pm 1,5 \text{ nm}$
$c \rightarrow 0$	$M_w$	$(3,70 \pm 0,10) \cdot 10^7 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$
	$A_2$	$(-3,00 \pm 0,13) \cdot 10^{-5} \text{ cm}^3 \cdot \text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$

caótipos, así como mercaptoetanol como agente disociador de los enlaces S–S, tras el cual se obtuvieron valores solo superiores a 205 kDa, tal y como se determinó mediante cromatografía en gel de poliacrilamida (PAGE) [11,16]. La alta masa molecular obtenida en este trabajo puede estar relacionada con el alto grado de polimerización de los aminoácidos biosintetizados por la oveja, así como a un parcial entrecruzamiento remanente a través de cistinas.

El valor negativo del segundo coeficiente del virial  $A_2$ , relacionado con la interacción polímero–disolvente, indica que la interacción con el agua es termodinámicamente desfavorable [17,18]. De hecho se ha observado que tras ser almacenadas durante periodos prolongados (fenómeno observado a los dos meses) la queratina coalescía precipitando casi totalmente desde la fase acuosa.

**Conducta térmica de la disolución de queratina.** La conducta térmica de las disoluciones de queratina extraídas se ha analizado mediante calorimetría diferencial de barrido. Se ha observado que al calentar las disoluciones de queratina en agua ( $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) a temperaturas superiores a  $50^\circ\text{C}$ , la queratina coalesce dando lugar a una separación de fases en el seno de la



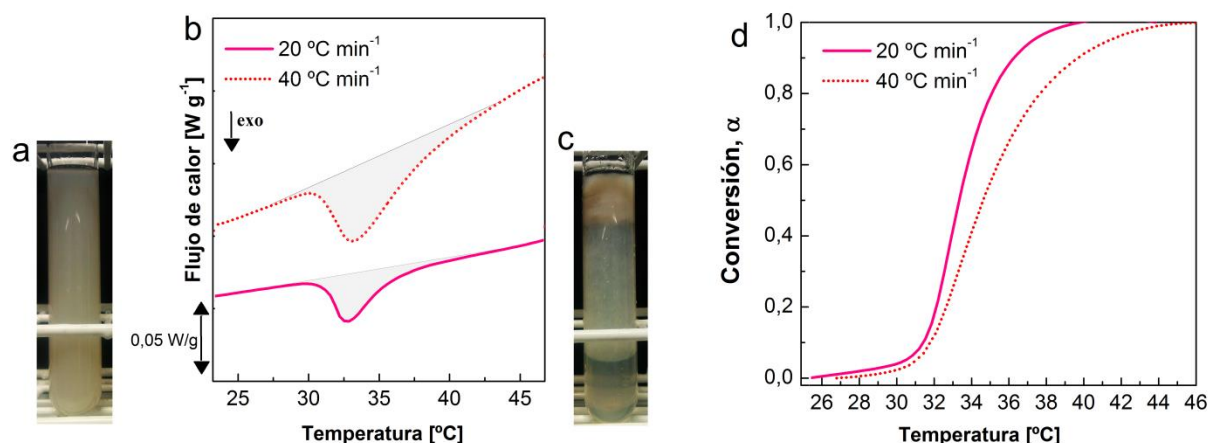


Figura 4. Estudio de la desnaturalización térmica mediante calorimetría diferencial de barrido. a) Vial de disolución acuosa de queratina ( $\sim 4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) a 25°C. b) Barridos de calentamiento de la dispersión acuosa ( $\sim 4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de queratina de oveja *Latxa* a 20 y 40°C min<sup>-1</sup>. c) Vial donde se observa la coalescencia de la queratina y separación de fases tras 10 min a 70°C. d) Curvas de conversión del proceso de desnaturalización

dispersión (Figura 4a,c). A concentraciones menores ( $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) este fenómeno es más lento y visualmente menos apreciable. Este proceso puede relacionarse con interacciones intermoleculares de entrecruzamiento tales como la reformación de cistinas o la formación de estructuras empaquetadas por enlaces de hidrógeno. La dependencia de este comportamiento con la concentración de queratina se relaciona con el valor negativo de  $A_2$ , ya que la coalescencia está favorecida cinéticamente mediante un estímulo térmico en función del valor termodinámico  $A_2$ . Mediante DSC se ha determinado el carácter exotérmico de este proceso. En la Figura 4b se muestran los termogramas de flujo de calor, ( $\text{W}\cdot\text{g}^{-1}$ ) frente a la temperatura, a dos velocidades de calentamiento. La Tabla 2 muestra los valores de entalpía,  $\Delta H$ , del proceso determinado integrando el área del pico exotérmico observado en el intervalo de 27–40°C. Los valores obtenidos de la integración han sido normalizados respecto a la concentración de la disolución de queratina.

Puede observarse que la entalpía de la transición aumenta con la velocidad de calentamiento,  $\beta$ , pese a estar el valor normalizado respecto a la velocidad de calentamiento.

Tabla 2. Parámetros de desnaturalización obtenidos mediante DSC para dos velocidades de calentamiento.

$\beta$ (°C·min <sup>-1</sup> )	$T_p$ (°C)	$T_{\alpha=0,5}$ (°C)	$\Delta H_{g,\text{disolución}}$ J·g <sup>-1</sup>	$\Delta H_{g,\text{queratina}}$ J·g <sup>-1</sup>
20	32,7	33,3	-0,37	-92,7
40	33,1	34,6	-0,50	-124,5

Esta tendencia puede estar relacionada con una inercia térmica. Es por ello que los valores de  $\Delta H_{g, queratina}$  deben ser considerados de manera orientativa. Cabe mencionar que estos valores coinciden con el orden de valores obtenidos para procesos de cristalización y fusión de varios polímeros semicristalinos [19,20], por lo que podría atribuirse a procesos relacionados con cambios conformacionales de la queratina en solución acuosa, vinculados a procesos intermoleculares o intramoleculares de largo alcance, de manera análoga a una cristalización. La Figura 4d muestra la conversión,  $\alpha$ , del proceso frente a la temperatura, calculada según:

$$\alpha = \frac{\Delta H_T}{\Delta H_{g, disolución}} \quad (2)$$

donde  $\Delta H_T$  representa el calor liberado hasta una temperatura,  $T$ , y  $\Delta H_{g, disolución}$  la entalpía total del proceso en fase acuosa.

**Caracterización de la queratina y sus mezclas con glicerol.** La queratina extraída se ha caracterizado mediante espectroscopia infrarroja utilizando para ello un film de queratina obtenido mediante deposición de una gota de dispersión de queratina sobre una pastilla de KBr, tras eliminar el agua en una estufa de vacío. La Figura 5a muestra el espectro infrarrojo de la queratina, en el cual se pueden observar las bandas características de los grupos funcionales de las proteínas, tales como la vibración de tensión N-H ( $3.424 \text{ cm}^{-1}$ ), banda amida A, C-H ( $2.950 \text{ cm}^{-1}$ ), C = O ( $1.652 \text{ cm}^{-1}$ ), banda amida I y C-N ( $1.232 \text{ cm}^{-1}$ ), amida III, y combinación de las vibraciones de flexión N-H y tensión C-N ( $1.537 \text{ cm}^{-1}$ ), banda amida II [21,22].

La capacidad de formación de películas de queratina se ha estudiado preparando films mediante vaciado y evaporación de la dispersión acuosa de queratina depositada en placa *Petri*. Se ha observado que las películas preparadas a partir de las soluciones de queratina dan lugar a películas cuarteadas y frágiles. Por ello, se han preparado sistemas basados en queratina con diferentes contenidos de glicerol, 38 y 86 %masa. Los sistemas preparados con elevado contenido de plastificante, 86 % masa de glicerol, dan lugar a mezclas fluidas tras la evaporación del disolvente. Sin embargo, con menor contenido de plastificante, 38% masa de glicerol, presentan buena capacidad de formación de películas y resultan en materiales blandos. Por lo tanto es posible modular la conducta final de las películas ajustando el contenido de plastificante. Los sistemas de queratina y queratina-glicerol han sido analizados mediante calorimetría diferencial de barrido (Figura 5b). El material con mayor proporción de glicerol presenta una transición vítrea a  $-18^\circ\text{C}$ . La endoterma ancha centrada a  $100^\circ\text{C}$ , puede relacionarse con la presencia de agua en las muestras

además de con la transición hélice–ovillo de la queratina, como ha sido observado para la gelatina [23].

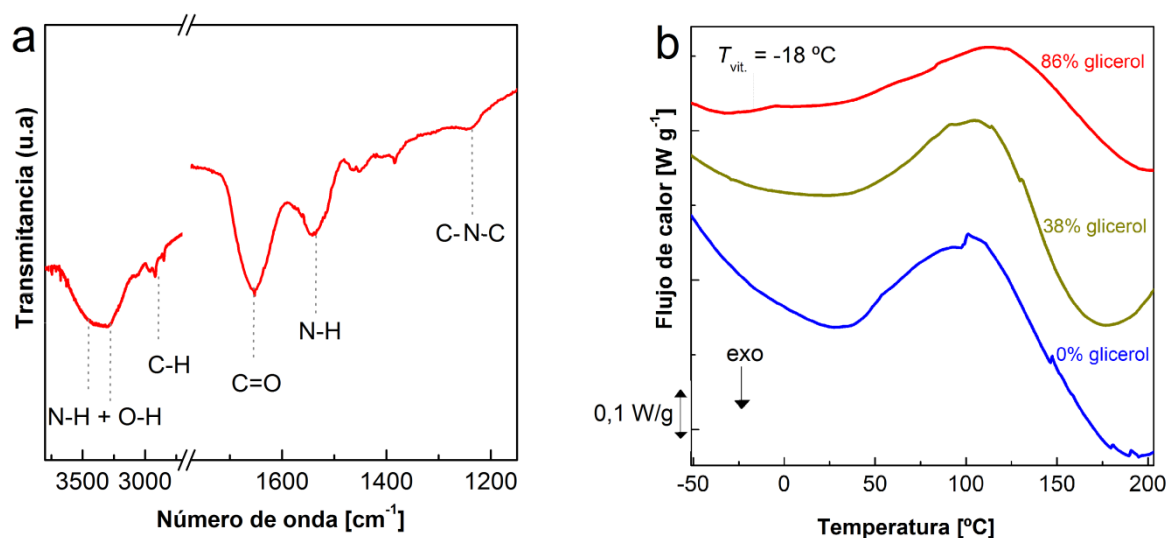


Figura 5. Caracterización de la queratina extraída. a) Espectro de IR de la queratina, b) Termogramas DSC de la queratina mezclada con distintas proporciones de glicerol.

## CONCLUSIONES

La extracción de la queratina de la lana de la oveja *Latxa* se ha realizado en medio básico y empleando tioglicolato como agente desnaturalizante de los enlaces disulfuro,  $-S-S-$ . Se han obtenido rendimientos de disolución en torno al 51% en masa. Se ha analizado mediante microscopía óptica la evolución morfológica de las fibras de lana durante el tratamiento. El peso molecular, radio de giro y segundo coeficiente del virial de la queratina extraída en medio acuoso se han determinado mediante dispersión estática de luz. Se ha obtenido un valor negativo del segundo coeficiente del virial y se ha vinculado con la transición térmica observada al calentar las disoluciones, en las que se observa una coacervación de la queratina, pudiéndose considerar un proceso termodinámicamente favorable y acelerado mediante el estímulo térmico. La queratina extraída presenta bandas de infrarrojo comunes con otras proteínas y tras ser mezclada con glicerol da lugar a materiales con distinta consistencia, determinándose 38% masa de glicerol como la cantidad máxima para preparar películas con estabilidad dimensional.

**Agradecimientos.** Los autores agradecen al Gobierno Vasco su financiación en el marco del Grupo Consolidado IT-776-13. Los autores también agradecen al *Ministerio de Economía y Competividad del Gobierno de España (MINECO)* y a la *Unión Europea (Fondo Europeo de Desarrollo Regional, FEDER)* por la financiación. También agradecen a la unidad *SGIker "Macroconducta-Mesoestructura-Nanotecnología"* de la UPV/EHU.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Asociación de elaboradores de queso de oveja *Latxa*. <http://www.artzai-gazta.net/>
- [2] Gómez M *Latxa* cara negra y cara rubia". *Catálogo etnológico*. Razas Ovinas. [http://www.nekanet.net/razas/latxa\\_c.htm](http://www.nekanet.net/razas/latxa_c.htm)
- [3] DRAE. "Queratina". Edición 2014
- [4] Gacén-Guillen J Aspectos químicos del blanqueo de la lana con peróxido de hidrógeno: Modificación química de la queratina. *Bol. Instit. Investig. Tex. Cooper. Industr.*, **39**, 43 (1964)
- [5] T. Fujii, D. Li (2008). Preparation and properties of protein films and particles from chicken feather. *J. Biol. Macromol.*, **8**(2), 48–55.
- [6] M.V. Salazar-Cedillo. Determinación del método para la obtención de queratina cosmética a partir de plumas gallináceas. Trabajo fin de Carrera, Universidad Central de Ecuador, Quito, Ecuador 2013.
- [7] Saravanan S, Sameera DK, Moorthi A, Selvamurugan N "Chitosan scaffolds containing chicken feather keratin nanoparticles for bone tissue engineering", *Intern. J. Biol. Macromol.*, **62**, 481 (2013)
- [8] J.G. Rouse, M.E. Van Dyke (2010). A review of keratin-based biomaterials for biomedical applications. *Materials*, **3**: 999–1014.
- [9] D.R. Goddard, L. Michaelis (1934). A study on keratin. *J. Biol. Chem.*, **106**: 605–614.
- [10] D.R. Goddard, L. Michaelis (1935). Derivatives of keratin. *J. Biol. Chem.*, **112**: 361–371.
- [11] A. Nakamura, M. Arimoto, K. Takeuchi, T. Fujii (2002). A rapid extraction procedure of human hair proteins and identification of phosphorylated species. *Biol. Pharm. Bull.*, **25** (5) 569–572.
- [12] A. Negri, H. Cornell, D. Rivett (1993). A model for the surface of keratin fibers, *Textile Res. J.*, **63**, 109–115.
- [13] S. Vilches-Maldonado. Nuevos tratamientos de lanas con enzimas. CSIC, Universitat de Barcelona, Barcelona, España, 2005.
- [14] P. Debye (1944). Light scattering in solutions. *J. Appl. Phys.*, **15** (4): 338.
- [15] Zimm BH "The scattering of light and the radial distribution function of high polymer solutions", *J. Chem. Phys.*, **16** (12), 1093(1948)
- [16] S. Reichl (2009). Films based on human hair keratin as substrates for cell culture and tissue engineering. *Biomaterials*, **30**, 6854–6866.
- [17] Katime I, Katime O, Katime D "Introducción a la Ciencia de los materiales polímeros: Síntesis y caracterización". Servicio Editorial de la Universidad del País Vasco, Bilbao 2010; Flory PJ "Thermodynamic of Polymer Solutions" en *Principles of Polymer Chemistry*. Cornell Univ Press.
- [18] Krigbaum WR, Flory PJ "Statistical mechanics of dilute polymer solutions. IV. Variation of the osmotic second coefficient with molecular weight", *J. Am. Chem. Soc.*, **75**(8), 1775 (1953)
- [19] Bouza R, Marco C, Martín Z, Gómez MA, Ellis G, Barral L "Comportamiento de cristalización y fusión en compuestos de polipropileno y derivados de madera", *Rev. Iber. Polím.*, **8**, 1 (2007)
- [20] Fernández-d'Arlas B, González I, Eceiza A "Hacia la mimesis de la seda de araña a partir de poliuretanos con segmentos cortos de unidades rígidas y semiflexibles", *Rev. Latin Am. Metal. Mat.*, **35**(1), 39 (2015)
- [21] Boulet-Audet M, Lefèvre T, Buffeteau T, Pézolet M "ATR-IR spectroscopy: An efficient technique to quantitatively determine the orientation and conformation of proteins in single silk fibers", *Appl. Spectrosc.*, **62**, 956 (2008)
- [22] Rajkhowa R, Hu X, Tsuzuki T, Kaplan DL, Wang X "Structure and biodegradation mechanism of milled bombyx mori silk particles", *Biomacromolecules*, **13**, 2503 (2012)
- [23] Mondragon G, Peña-Rodríguez C, Gonzalez A, Eceiza A, Arbelaiz A "Bionanocomposites based on gelatin matrix and nanocellulose", *Eur. Polym. J.*, **62**, 1 (2015)