

Estudo da composição, estrutura e efeito da absorção de água em cascos bovinos oriundos da região Nordeste

Wendell Bruno Almeida Bezerra^{1*}, Ulisses Oliveira Costa¹, Fabio da Costa Garcia Filho¹, Sergio Neves Monteiro¹

¹Instituto Militar de Engenharia (IME).

Praça General Tibúrcio, 80, 22290-270, Praia Vermelha, Rio de Janeiro, RJ, Brasil,

*wendellbez@ime.eb.br

RESUMO: Ao longo de milhares de anos, os materiais naturais evoluíram, desenvolvendo estruturas hierárquicas complexas e multifuncionais. Um exemplo disso, os cascos bovinos, são materiais queratinosos diferenciados de outros tipos de cascos cuja estrutura e composição ainda não são tão conhecidas como a dos cascos equinos. Dessa forma, o presente trabalho se propôs a investigar a influência da água absorvida na estrutura e composição de cascos bovinos oriundos da região Nordeste do Brasil. Os cascos foram avaliados através de análises de difração de raios X (DRX), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Pode-se observar o efeito da água na matriz de queratina amorfa dos cascos através das análises de DRX e FTIR, bem como identificar diferentes zonas e dimensões dos túbulos na estrutura através das imagens de MEV. Os resultados apresentam um ponto de partida para a correlação entre a estrutura e os mecanismos de absorção de impacto nesses materiais.

PALAVRAS-CHAVE: Queratina. Cascos bovinos. Absorção de água. Composição. Estrutura.

ABSTRACT: Over thousands of years natural materials have evolved to complex and multifunctional hierarchical structures. An example of this, bovine hooves are keratinous materials differentiated from other types of hooves whose structure and composition are not yet as well-known as that of equine hooves. Thus, the present work aimed to investigate the influence of absorbed water on the structure and composition of bovine hooves from the Northeast region of Brazil. The hulls were evaluated using X-ray diffraction analysis (XRD), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and scanning electron microscopy (SEM). The effect of water on the amorphous keratin matrix of the hooves can be observed through DRX and FTIR analyses, as well as identifying different zones and dimensions of the tubules in the structure through SEM images. The results present a starting point for the correlation between structure and impact absorption mechanisms in these materials.

KEYWORDS: Keratin. Bovine hooves. Water absorption. Composition. Structure.

1. Introdução

Muitos materiais biológicos desenvolveram-se de tal modo a apresentar estruturas multifuncionais e capacidade de absorver consideráveis quantidades de energia sem fraturar. Podem ser citadas funções como proteção (*e.g.*: concha de molusco, ossos), defesa e agressão (*e.g.*: garras, dentes, presas, chifres e galhadas), suporte (*e.g.*: ossos, concha de molusco e cascos) e mastigação (*e.g.*: dentes) [1]. Esses materiais são compostos por diferentes componentes estruturais com características químicas e físicas diferentes [2]. Dentre esses componentes, destacam-se os constituídos à base de queratina [3].

A queratina é formada por cadeias de polipeptídios. Esse componente apresenta variantes que podem ser encontradas tanto em mamíferos, constituindo cabelo, unhas, cascos, chifres e camada epidérmica da pele, quanto em répteis e aves, em suas garras, escamas, penas e bicos [4]. Inicialmente, alguns desses materiais atraem maior interesse por apresentarem a capacidade de absorver uma considerável quantidade de energia e resistir ao impacto (*e.g.*, cascos e chifres) [1, 3–5].

As queratinas podem ser classificadas como tipos α e β . Ambas apresentam uma estrutura do tipo matriz-filamentos, observada em cada tipo na forma de: filamentos intermediários (FIs) de 7 nm de diâmetro, no caso da α -queratina, e filamentos de 3 nm de diâ-

metro na β -queratina, ambos embutidos em uma matriz de queratina amorfa. [4]. Nesse sentido, a água desempenha um papel de fundamental importância nas propriedades mecânicas dos materiais biológicos estruturais. Similarmente, as propriedades mecânicas da α -queratina e da β -queratina são influenciadas pelo conteúdo de água.

De modo geral, a presença de água define as características estruturais e as propriedades físicas das proteínas e substâncias orgânicas atuando como plastificante nos materiais biológicos, aumentando sua ductilidade e diminuindo a tenacidade. Dessa forma, sem água, os materiais biológicos perdem suas propriedades mecânicas originais e tornam-se mais frágeis [2]. O mesmo ocorre para a queratina: conforme se aumenta a umidade, a rigidez e a resistência diminuem, enquanto a tensão de ruptura aumenta [4].

Através da difração de raios X e estudos experimentais, trabalhos anteriores revelaram que se pode considerar as proteínas da matriz sensíveis à água, enquanto os FIs são cristalinos e não são afetados mecanicamente pela umidade [6-10]. De modo geral, pode-se estender isso aos materiais queratinosos, visto que os FIs não se alteram nas diferentes queratinas rígidas dos mamíferos [6]. Diferentes modelos foram propostos para explicar como ocorre a interação entre as moléculas de água e as proteínas da matriz.

Segundo os modelos propostos:

- a. A água pode agir como um agente de inchamento, formando uma ligação cruzada com as cadeias, resultando em uma redução na interação entre as cadeias e um aumento no espaço intermolecular [10];
- b. A água pode quebrar/substituir as ligações secundárias presentes entre as proteínas ricas em glicina/tirosina na fase matriz, como as ligações de hidrogênio, resultando em uma maior mobilidade das proteínas [7,9];
- c. A água pode formar uma rede tridimensional de queratina-moléculas de água que age como um plastificante, resultando em menor rigidez e maior mobilidade segmental da estrutura molecular da matriz [6,10].

Os materiais biológicos queratinosos, que apresentam diferentes estruturas tendo como compo-

nente principal a queratina, possuem suas propriedades diretamente ligadas à sensibilidade de tal componente. Quando desidratados, esses materiais perdem suas propriedades mecânicas originais e tornam-se mais frágeis. Dessa forma, para se aferir corretamente as propriedades mecânicas dos materiais biológicos, é de suma importância levar em consideração o grau de hidratação [2].

Todavia, antes de conseguir aplicar as estruturas biológicas na fabricação de materiais bioinspirados, é necessário um conhecimento aprofundado das relações entre estrutura e propriedades nesses materiais complexos. Vários estudos têm se dedicado a esse paradigma, em especial cascos equinos e chifres de carneiros-selvagens americanos [5, 11,12]. Além destas, alguns materiais de outras espécies tiveram suas estruturas e propriedades analisadas, como os cascos bovinos [13-16], porém aplica-se pouco foco na relação entre estrutura e comportamento dinâmico.

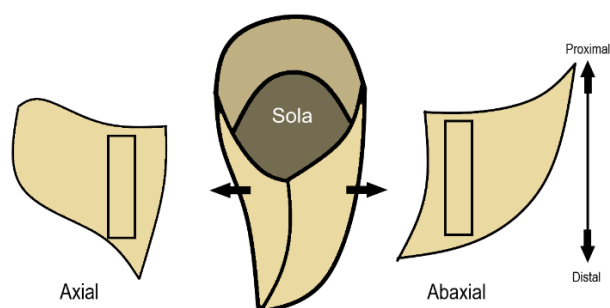
Com base na literatura, a análise dessas características em materiais biológicos queratinosos demonstra-se útil no desenvolvimento de sistemas e estruturas bioinspirados dos quais se espera desempenhos cada vez melhores com os subseqüentes aprimoramentos na tecnologia de processamento e produção de materiais.

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho é estudar as relações entre composição, estrutura e efeito da água em materiais biológicos queratinosos, como cascos bovinos, visando possibilitar um ponto de partida para o desenvolvimento de novos materiais bioinspirados resistentes ao impacto.

2. Materiais e métodos

Cascos de espécies de bovinos oriundos do Nordeste brasileiro foram estudados para análise de sua composição e estrutura. Os cascos de diferentes animais foram obtidos no matadouro municipal da cidade de Juazeiro do Norte, no Ceará. Os cascos foram lavados e, posteriormente, deixados para secagem à temperatura ambiente, sem controle específico de umidade. A Figura 1 apresenta o casco bovino com suas respectivas regiões anatômicas, consideradas na preparação das amostras.

Fig. 1 - Posições anatômicas dos cascos e regiões de amostragem. Fonte: Autoria própria.



2.1 Absorção de água

Com o objetivo de avaliar o tempo necessário até a hidratação completa dos cascos após imersão, foram realizados testes de absorção de água. Por ausência de uma norma específica para materiais naturais, os testes foram baseados na norma ASTM D570-98(2018). Foram preparadas cinco (5) amostras de duas regiões distintas da parede abaxial dos cascos bovinos, caracterizando assim dois grupos: abaxial-proximal (AB-P) e abaxial-distal (AB-D). As amostras foram pesadas e imersas em água deionizada e novas pesagens foram realizadas após períodos de imersão de: cinco (5min), dez (10min), vinte (20min) e trinta (30min) minutos, e uma (1h), duas (2h), três (3h), quatro (4h), vinte e quatro (24h), quarenta e oito (48h), setenta e duas (72h) e noventa e seis (96h) horas. Após o tempo final de imersão, as amostras foram separadas, pesadas, e o teor de umidade delas foi avaliado, seguindo o descrito em trabalhos anteriores [14,16]. As amostras foram

colocadas em uma estufa a 70°C, durante um período de sete (7) dias. O teor de umidade (TU %) pode ser determinado através da Equação 1:

$$TU \% = \frac{\text{massa úmida} - \text{massa seca}}{\text{massa úmida}} \times 100\% \quad (1)$$

2.1 Difração de raios X (DRX)

As amostras foram preparadas de duas regiões distintas da parede abaxial, nomeadamente abaxial-proximal (AB-P) e abaxial-distal (AB-D). Uma amostra de cada grupo foi submetida a cada uma das duas condições distintas de hidratação: condicionada à temperatura ambiente (SA) e totalmente hidratadas (100). Além disso, na amostra AB-D foram avaliadas as superfícies da parede: interna (PI) e externa (PE). Dessa forma, as amostras foram nomeadas de acordo com a Tabela 1.

As análises foram realizadas em um difratômetro de raios X, modelo X'Pert Pro Panalytical, disponível no Instituto Militar de Engenharia (IME), utilizando fonte de radiação CoK α (1,790307 Å). Os parâmetros utilizados foram: voltagem de 40 kV, corrente de 40 mA, degrau de 0,04 grau. Os espectros foram obtidos para valores de 2 θ de 5 a 50°, com base na literatura encontrada [18,19].

Através do *software* OriginPro 2019, os dados obtidos foram submetidos à remoção de ruído, pelo método de Savitzky-Golay, e as curvas foram ajustadas, com deconvolução dos halos, a fim de determinar com maior precisão a posição dos picos.

Tab. 1 - Nomenclatura das amostras para análise de DRX nas diferentes condições estudadas

Região	Hidratação	Superfície	Nomenclatura
Abaxial-distal (AB-D)	SA	Externa (PE)	AB-D-SA-PE
		Interna (PI)	AB-D-SA-PI
	100	Externa (PE)	AB-D-100-PE
		Interna (PI)	AB-D-100-PI
Abaxial-proximal (AB-P)	SA	Externa	AB-P-SA
	100	-	AB-P-100

Fonte: Autoria própria

2.2 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Para melhor compreender o efeito da hidratação na estrutura química dos componentes dos cascos, foram realizadas análises de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) com diferentes condições das amostras. Estas foram preparadas de duas regiões distintas da parede abaxial, denominadas abaxial-proximal (AB-P) e abaxial-distal (AB-D). De cada grupo de região, foram preparadas duas condições de hidratação: com secagem à temperatura ambiente (SA) e totalmente hidratadas (100).

As análises foram realizadas em um equipamento PerkinElmer Frontier FT-IR/FIR, no modo de transmitância com pastilha de KBr, com resolução de 4 cm^{-1} , utilizando uma faixa de números de onda de 4.000 a 400 cm^{-1} . A escolha do modo de transmitância utilizando pastilhas de KBr foi feita para comparar os espectros obtidos com os reportados para outros materiais queratinosos e membranas da queratina dos cascos [18,19].

2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Visando caracterizar a morfologia da superfície da parede dos cascos e sua estrutura interna, foram realizadas análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Visto que os materiais não são condutores de eletricidade, eles foram submetidos a um recobrimento metálico superficial utilizando o equipamento LEICA, modelo EM ACE600, e as análises foram realizadas em um equipamento modelo Quanta FEG 250, da FEI, ambos disponíveis no IME.

3. Resultados e discussão

3.1 Absorção de água

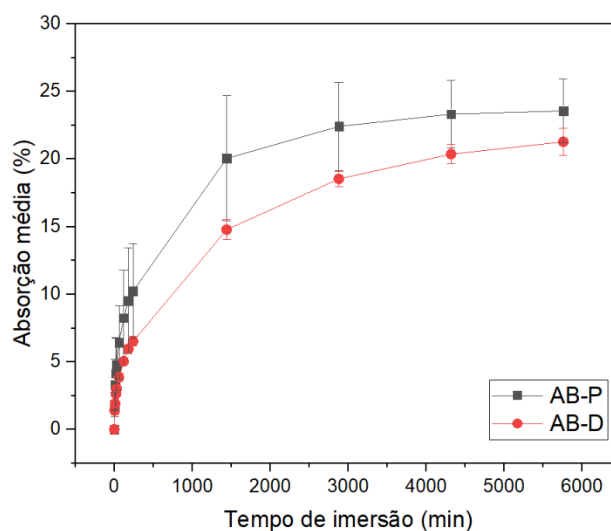
Sabe-se que o teor de umidade é um dos fatores que afetam as propriedades mecânicas dos materiais biológicos estruturais, em especial da parede dos cascos [14]. Sendo assim, visando agilizar o procedimento de preparação das amostras para os trabalhos

futuros, foram realizados testes de absorção de água nas duas regiões distintas da parede abaxial dos cascos bovinos.

A Figura 2 apresenta os aumentos percentuais médios em peso observados nas amostras após os intervalos de tempo de imersão propostos. Observou-se uma absorção acelerada nos primeiros minutos com subsequente redução da taxa de absorção, devido à saturação de água na estrutura do material [20]. Comportamentos similares foram observados em outros materiais biológicos estruturais [9,21]. Além disso, é possível observar uma tendência assintótica dos pontos a um patamar a partir de três dias (4.320 min) de imersão. No caso dos chifres de órix, Kitchener (1987) relata a hidratação total do material, representada pelo patamar, a partir de 3 dias, enquanto, para os cascos equinos, a hidratação completa ocorre após 5 dias [9].

Apesar da aparente tendência a uma maior absorção, em média, por parte da parede abaxial-proximal, não foram observadas diferenças significativas entre as duas regiões. Após quatro dias de imersão (5.760 min), foram observados valores médios de $23,58 \pm 2,37\%$ para a região abaxial-proximal (AB-P) e $21,28 \pm 1,00\%$ para a região abaxial-distal (AB-D).

Fig. 2 - Absorção média de água (%) para cada região da parede abaxial dos cascos bovinos: proximal e distal.



Trabalhos anteriores estudaram o efeito da umidade relativa atmosférica no teor de umidade de diferentes cascos, especialmente os de único dígito, como de cavalos e burros [9,22]. Em ambos os casos, as curvas de teor de umidade *versus* umidade relativa atmosférica demonstram um crescimento exponencial do nível de hidratação dos cascos com o aumento na umidade relativa ambiente.

Baillie e colaboradores (2000) propuseram que a melhor forma de simular os níveis de hidratação presentes nos cascos *in vivo* seria através da imersão em meio aquoso. Dessa forma, espera-se que, pela presença dos túbulos na estrutura interna da parede, ocorra um efeito direto da capilaridade na hidratação obtida. Todavia, nos cascos equinos, observou-se que não houve a formação de gradientes de hidratação (*i.e.*, maior hidratação na região distal) esperados para esse caso [20]. Ao contrário disso, observou-se

uma taxa de desidratação maior na região distal devido à presença das aberturas nos túbulos.

Os valores médios e os respectivos desvios-padrões dos teores de umidade obtidos para as amostras dos dois grupos estudados são apresentados na Tabela 2. Na literatura, podem ser encontrados valores para os cascos bovinos que variam de 3,11 a 35,50 %p/p H₂O, dependendo das condições de hidratação ou desidratação empregadas [14,16]. Os valores encontrados no presente trabalho estão bem próximos dos reportados por Wang e colaboradores (2020), de 28,05 e 27,15%. Além disso, foi observada uma diferença significativa (*i.e.*, intervalo de confiança = 95%) nos valores do teor de umidade das duas regiões estudadas, o que é similar ao reportado para os cascos equinos [9]. O teor de umidade dos cascos secos na umidade ambiente (SA) foi de 10,03 e 11,32% para as regiões abaxial-distal (AB-D) e abaxial-proximal (AB-P), respectivamente.

Tab. 2 - Teor de umidade médio das amostras após hidratação

Amostra	Teor de umidade médio (%p/p H ₂ O)	Desvio-padrão
AB-P-100	25,05	1,50
AB-D-100	22,52	0,80

3.2. Difração de raios X (DRX)

A estrutura física das queratinas é estudada há bastante tempo, sendo amplamente reportada na literatura [4,8]. Através da difração de raios X, é possível identificar três padrões característicos: padrão α , padrão β e padrão de penas, além do padrão amorfo. Na maioria dos mamíferos, a queratina encontrada apresenta o padrão α [4], exibindo dois espaçamentos típicos: um relacionado à distância entre as moléculas que compõem a α -hélice, de 9,80 Å, e outro relacionado ao passo entre as duas moléculas da α -hélice, de 5,15 Å [23].

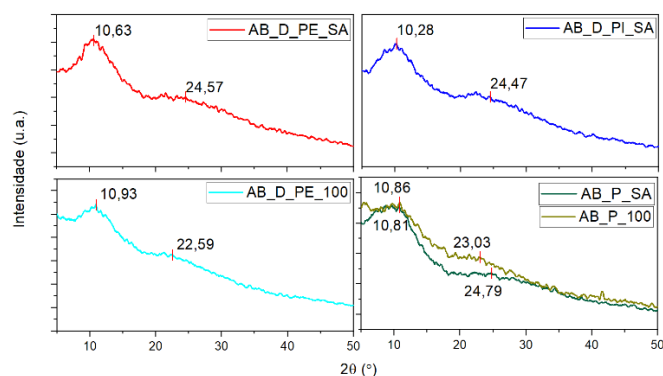
Os difratogramas obtidos para as amostras da parede abaxial do casco bovino, das regiões proximal e distal nas duas condições de hidratação, são apresentados na Figura 3. Através do ajuste das curvas, foi possível observar dois halos característicos nas

diferentes amostras. A presença de halos ao invés de picos está associada tanto ao fato de a parede dos cascos apresentarem uma matriz de queratina amorfa quanto pelo fato dos filamentos intermediários (FIs) apresentarem uma ordem de cristalinidade no nível nanométrico.

O primeiro halo foi encontrado em ângulos de Bragg (2θ) que variam entre 10,28 e 10,93°. A partir desses valores, os espaçamentos interplanares puderam ser identificados, conforme exposto na Tabela 3, resultando em um espaçamento médio de $9,60 \pm 0,24$ Å. Não foi identificada uma variação significativa entre a estrutura das paredes interna (AB_D-PI-SA) e externa (AB_D-PE-SA) dos cascos, ou entre as regiões distal e proximal. O segundo halo foi encontrado em ângulos de Bragg (2θ) de 22,59 a 24,79°. Os espaçamentos relacionados a esses ângulos são apresentados na Tabela 3. Pôde-se observar um espaçamento

médio de $4,33 \pm 0,18 \text{ \AA}$, bem próximo do que é reportado para outros materiais queratinosos, conforme mostrado na mesma tabela.

Fig. 3 - Difratogramas obtidos para as amostras das diferentes regiões do casco e em diferentes condições de hidratação.



A fim de se evitar a variabilidade inerente dos materiais naturais, as mesmas amostras foram avaliadas nas duas condições de hidratação, secas ao ambiente (SA) e imersas (100). Dessa forma, a comparação das duas condições permitiu o melhor entendimento da influência da hidratação na estrutura física dos cascos. Observou-se uma leve tendência à diminuição do espaçamento relacionado ao primeiro halo: de 9,66 para 9,40 Å na região distal (AB_D), e de 9,50 para 9,46 Å na região proximal. De modo oposto, uma tendência ao aumento foi observada no espaçamento referente ao segundo halo: de 4,21 para 4,57 Å na região distal (AB_D), e de 4,17 para 4,48 Å na região proximal.

Acredita-se que esses halos estão diretamente associados aos espaçamentos reportados para a estrutura da α -hélice da queratina [8,19]. Os resultados encontrados reforçam a teoria de que as moléculas de água podem substituir ligações secundárias, como as de hidrogênio, presentes entre as proteínas ricas em glicina/tirosina na fase matriz [7,9]. A introdução das moléculas de água na estrutura gera um aumento na distância do passo da α -hélice, resultando em um aumento nos espaçamentos observados em ambas as regiões no segundo halo, o que sugere a diminuição do empacotamento da estrutura cristalina da queratina nos FIs.

Tab. 3 - Espaçamento interplanar das amostras analisadas no presente trabalho e de materiais queratinosos reportados na literatura

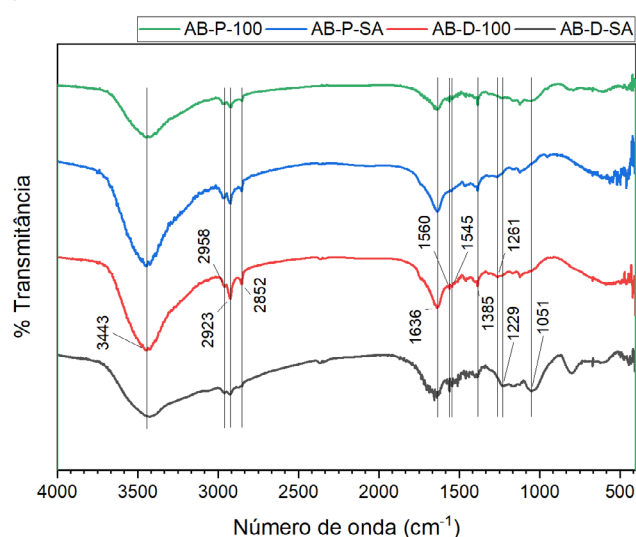
Material	d (Å)	Referência
AB_D_PE_SA	4,21	Presente trabalho (PT)
	9,66	
AB_D_PI_SA	4,22	
	9,99	
AB_D_PE_100	4,57	
	9,40	
AB_P_SA	4,17	
	9,50	
AB_P_100	4,48	
	9,46	
Lã	4,35	Wu e colaboradores (2017)
Queratina pura	4,46	
Queratina de cascos bovinos	4,62	Valkov e colaboradores (2020)
Queratina de cabelos	4,48	
Queratina de unhas	4,27	
Padrão da α -queratina	5,15	Fraser, MacRae e Rogers (1972)
	9,80	

3.3. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A composição da parede dos cascos bovinos e o efeito da hidratação neles podem ser avaliados através do estudo da estrutura das moléculas que compõem o material pela espectroscopia no infravermelho. Os espectros obtidos para as amostras extraídas das regiões proximal e distal da parede abaxial dos cascos, nas duas condições de hidratação, secas e hidratadas, são apresentados na Figura 4. Pode-se observar a presença de bandas comuns a todas as amostras, com maior ou menor intensidade de transmitância associada.

Destacam-se as bandas encontradas nas frequências entre 3.600 e 3.200 cm^{-1} , relacionadas às vibrações de estiramento de N-H e O-H; entre 2.958 e 2.852 cm^{-1} , referentes às vibrações de estiramento de C-H; e de 1.636 cm^{-1} , associada às vibrações de estiramento de C=O e C-N presentes nas amidas I [19].

Fig. 4 - Espectros de infravermelho das amostras extraídas das diferentes regiões da parede abaxial dos cascos bovinos, nas diferentes condições de hidratação estudadas



Além disso, foram observadas bandas em 1.560 e 1.545 cm^{-1} que estão associadas ao modo de vibração de deformação angular de N-H e de estiramento de C-N e C-C das amidas II [19,24]. A Tabela 4 apre-

senta, resumidamente, as frequências relacionadas às principais bandas observadas, os modos de vibração associados e os valores reportados na literatura para outras estruturas queratinosas.

A principal diferença observada entre as regiões proximal e distal da parede dos cascos está relacionada à intensidade da banda presente em 1.051 cm^{-1} . Essa banda está associada às ligações S-C presentes na cisteína que compõe a queratina [24]. Dessa forma, acredita-se que a maior intensidade da banda observada na região distal pode estar associada a uma maior quantidade desse aminoácido na estrutura.

Em relação à condição de hidratação, foi possível observar um considerável aumento na intensidade da banda de O-H em 3.443 cm^{-1} , o que está diretamente relacionado ao nível de umidade das amostras [19]. Além disso, observando a razão entre as intensidades das bandas características de C=O e de N-H, pode-se verificar uma diminuição na intensidade desta em relação à primeira com o aumento do teor de umidade das amostras [25]. É possível observar também uma alteração na razão de intensidades das bandas de 1.636 e 3.443 cm^{-1} , após a hidratação das amostras. A maior intensidade na banda de 1.636 cm^{-1} , observada nas amostras hidratadas, pode estar associada à ocorrência mais frequente de ligações de hidrogênio [26]. No caso dos chifres de carneiro selvagem [25], reportou-se também uma variação na posição das bandas que foi associada ao aumento do teor de umidade, todavia esse fenômeno não foi observado no presente estudo.

Tab. 4 - Frequências das bandas de absorção observadas nas amostras estudadas e em outros materiais queratinosos estudados na literatura

Material	Tipo de vibração	N.º de onda (cm^{-1})	Ref.
Parede de cascos bovinos	Estiramento de N-H e O-H	3.600-3.200	Autor
	Estiramento de C-H	2.958-2.852	
	Estiramento de C=O e C-N de amidas I	1.636	
	Deformação angular de N-H e estiramento de C-N e C-C de amidas II	1.560-1.530	
	Deformação angular de C-H e estiramento de $-\text{CH}_3$	1.385	

Material	Tipo de vibração	N.º de onda (cm ⁻¹)	Ref.
Parede de cascos bovinos	Estiramento de C-N e deformação angular de C=O de amidas III	1.260-1.230	Autor
	Característica de cisteína	1.070-1.040	
Queratina de cascos caprinos	Estiramento de N-H e O-H	3.650-3.250	[27]
	Característica de amidas I	1.665-1.610	
	Característica de amidas II	1.550-1.520	
Queratina de cascos bovinos	Estiramento de N-H de amidas A e O-H de hidratação	3.355-3.295	[19]
	Estiramento de C=O e C-N de amidas I	1.650	
	Deformação angular de N-H e estiramento de C-N e C-C de amidas II	1.530	
	Estiramento de C-N e deformação angular de C=O de amidas III	1.230	
Parede de cascos caprinos	Estiramento de N-H e O-H	3.400	[24]
	Estiramento de C-H	2.960-2.870	
	Estiramento de CO de amidas I	1.655	
	Estiramento de CN e deformação angular de NH de amidas II	1.540-1.520	
	Deformação angular de C-H e estiramento de -CH ₃	1.387	
	Estiramento de CN e deformação angular de NH de amidas III	1.238	
	Característica de -S-C	1.051	
	Característica de S=O	1.076	

3.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

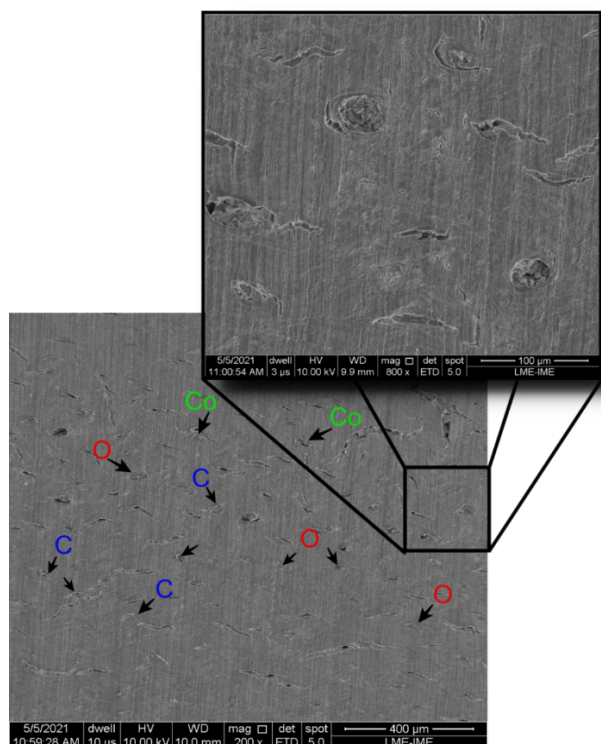
Com o objetivo de melhor entender a estrutura interna do material, amostras de diferentes regiões da parede abaxial dos cascos bovinos foram estudadas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras lixadas das regiões distal, intermediária e abaxial dos cascos foram observadas e suas micrografias são apresentadas a seguir.

A Figura 5 apresenta micrografias obtidas em diferentes aumentos da seção transversal da região proximal da parede dos cascos bovinos. É possível

observar a presença da abertura da estrutura dos túbulos, alguns selecionados e indicados por setas. Essa estrutura é bem conhecida e reportada em diversos materiais queratinosos, inclusive nos cascos bovinos [4,14,16,28–30]. Um dos fatores importantes a ser considerado é a quantidade desses componentes presentes em determinada área, conhecida por densidade de túbulos (mm⁻²). A importância desse fator está associada principalmente ao teor de umidade do material, visto que quanto menor a densidade de túbulos, maior a quantidade de material intertubular e, conseqüentemente, maior o teor de umidade [28].

Ainda na Figura 5, podem-se observar túbulos com formatos variados, como circulares, ovais e colapsados, similarmente ao reportado na literatura [29].

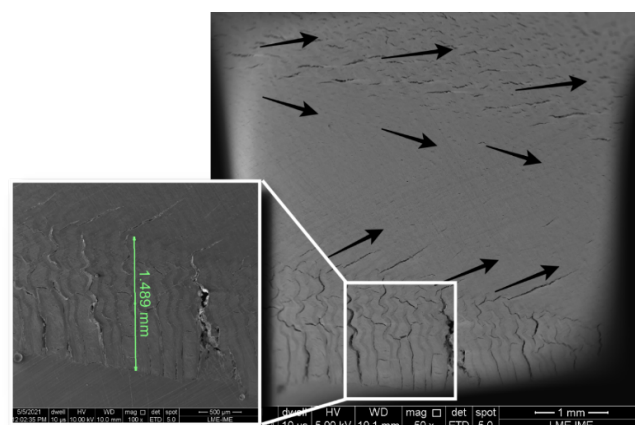
Fig. 5 - Micrografia da seção transversal da parede dos cascos na região proximal, evidenciando a presença de túbulos circulares (C), ovais (O), colapsados (Co) e trincas no material intertubular



Em todas as regiões estudadas, pode-se identificar quatro zonas distintas: lamelar, na parede interna; interna; intermediária, dividida em duas outras com formatos dos túbulos e orientações dos queratinócitos distintos; e externa, com túbulos colapsados. Essa divisão é bastante conhecida e reportada na literatura, todavia há escassez de informações sobre a orientação dos queratinócitos na matriz intertubular. A Figura 6 apresenta a parede no total, sendo a zona lamelar destacada pelo quadrado, com 1,49 µm de extensão na região distal. As setas indicam a orientação do material intertubular, que pôde ser identificada pela direção das trincas, decorrentes do corte das amostras. No caso dos cascos equinos, as trincas seguem a orientação dos contornos das células de queratina do material intertubular [5].

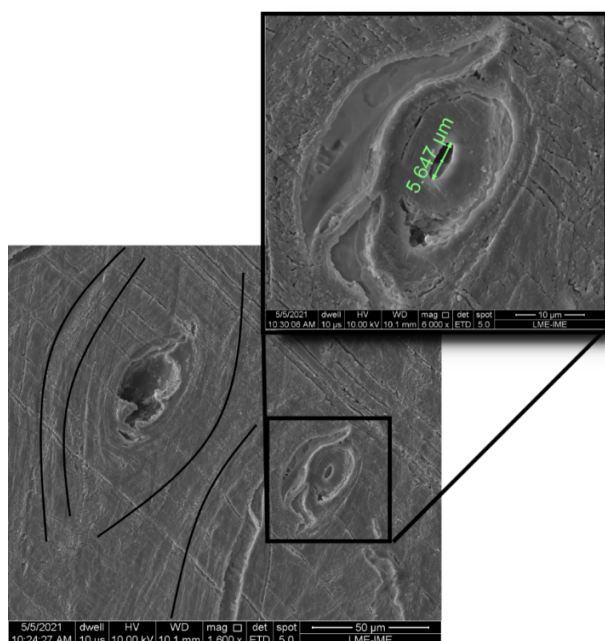
Esse fenômeno parece ocorrer também nos cascos bovinos aqui estudados, conforme ilustrado pela direção das setas. Dessa forma, pode-se identificar a zona interna, encontrada imediatamente após a zona lamelar, e caracterizada pela ausência de túbulos, seguida de uma região intermediária subdividida pelas diferentes orientações dos FIs [14,30]. A quarta e última zona é a mais próxima da parede externa e parece apresentar túbulos colapsados em sua maior parte.

Fig. 6 - Micrografia da seção transversal da parede dos cascos na região distal, evidenciando as quatro zonas observadas ao longo da parede e as direções de orientação dos FIs no material intertubular



A Figura 7 apresenta uma micrografia da seção transversal da parede dos cascos na região intermediária, entre as regiões distal e proximal. É possível observar dois túbulos adjacentes de diâmetros aparentemente distintos, porém de formato elíptico. Em função do formato bastante irregular do túbulo à esquerda, acredita-se que houve um arrancamento da região central do túbulo durante a preparação da amostra. Além disso, pode-se observar na figura a interface presente no material intertubular entre o que seriam as duas células de queratina. A estrutura em camadas proposta para os túbulos pôde ser evidenciada pela delaminação observada na região magnificada da Figura 7, que apresenta o diâmetro do túbulo (*i.e.*, 5,65 µm). Pode-se ver claramente a separação das camadas adjacentes ao lúmen do túbulo, com um pequeno feixe de material intertubular unindo as camadas.

Fig. 7 - Micrografia da seção transversal da parede dos cascos na região intermediária, evidenciando a região da interface entre as células de queratina e as dimensões de um dos túbulos observados nessa região



De modo similar ao reportado em estudos anteriores para outros cascos, uma variação no diâmetro dos túbulos foi identificada ao longo da parede dos cascos. A Figura 8 apresenta uma micrografia de um túbulo observado na região distal da parede, com 33,52 µm de diâmetro. Além da variação no diâmetro, em comparação ao túbulo da região intermediária, pode-se notar uma variação no formato, sendo este mais esférico no caso da região distal. Esses valores estão dentro do intervalo de diâmetros encontrado na literatura, que varia de 10 a 60 µm, se considerado o diâmetro da camada externa do túbulo [14,29–31].

A Figura 9 apresenta uma micrografia da região exatamente adjacente àquela mostrada na Figura 8. Através dessa figura, é possível observar fibrilas das camadas de células de queratina internas, separadas pela propagação de uma trinca. Acredita-se que a presença dessa estrutura em camadas, apresentando uma interface bem definida entre as células, está relacionada a uma maior capacidade de transferência de tensão e absorção de energia [14]. Isso ocorre em decorrência dos mecanismos de delaminação,

alongamento e ruptura das fibrilas de queratina presentes no material intertubular [5].

Fig. 8 - Micrografia de um único túbulo na seção transversal da parede na região distal, apresentando o diâmetro medido

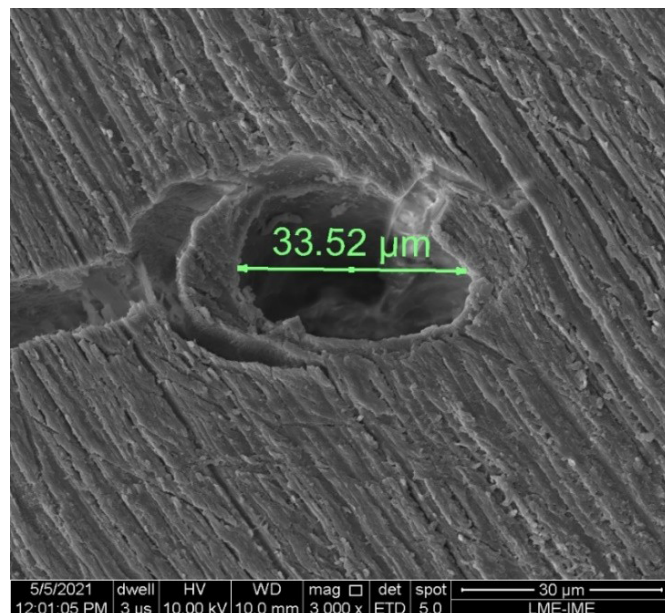
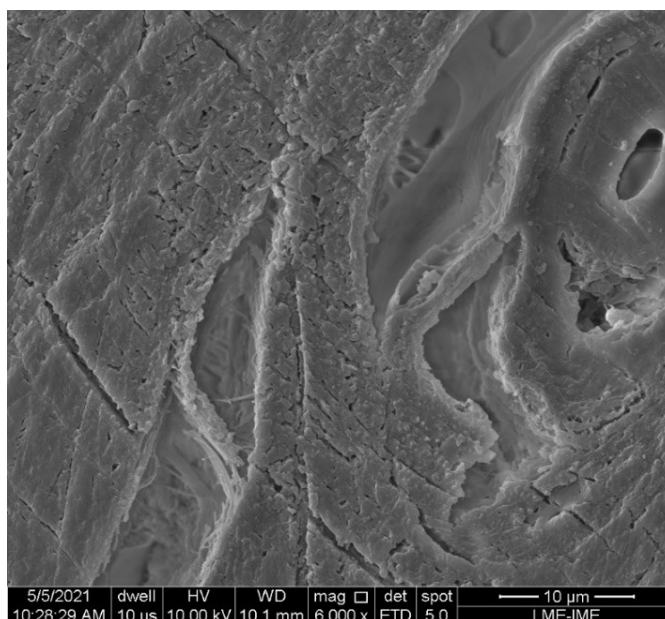


Fig. 9 - Micrografia da seção transversal da parede dos cascos na região intermediária, evidenciando uma trinca e os FIs nas camadas internas



4. Conclusão

As amostras extraídas da parede abaxial dos cascos bovinos tiveram sua estrutura e composição avaliadas através das técnicas de testes de absorção de água e teor de umidade, difração de raios X (DRX), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Pôde-se concluir o seguinte:

- Em ambas as regiões estudadas (*i.e.*, distal e proximal), o percentual em peso de água absorvida aproxima-se de um patamar após 3 dias de imersão. Isso pode indicar que um intervalo de imersão de 4 dias é suficiente para garantir a hidratação total da parede dos cascos. Além disso, não foram observadas diferenças significativas na absorção de água das diferentes regiões estudadas, todavia o teor de umidade após imersão foi maior para a região proximal, similar ao reportado para os cascos equinos.
- As análises de difração de raios X permitiram observar a periodicidade associada às moléculas da α -hélice da queratina dos cascos. A interpretação dos espaçamentos observados mostrou que não houve diferença significativa entre as paredes externa e interna na região distal, e houve diferença entre as regiões distal e proximal, sendo este espaçamento menor na região proximal. Além disso, em ambas as regiões, com o aumento do teor de umidade das amostras, houve uma redução nos espaçamentos observados, o que pode

ser indicativo da interação das moléculas de água com a estrutura da α -hélice da queratina.

- As análises de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) permitiram a identificação de diversas bandas de absorção relacionadas às estruturas químicas de amidas A, I, II e III presentes na composição das α -queratinas. Além disso, a variação do teor de umidade das amostras não revelou nenhum deslocamento nas bandas observadas, tendo sido apenas observada uma mudança na intensidade relativa das bandas.
- A observação da seção transversal da parede dos cascos em diferentes regiões permitiu observar a estrutura interna desse material. Túbulos de diferentes formas, de aspecto esférico a oval, e tamanhos, de 6 a 33 μm , puderam ser identificados na estrutura. Além disso, quatro zonas distintas foram identificadas e comparadas ao que foi reportado em estudos anteriores. Acredita-se que essas zonas, com FIs em diferentes orientações, podem contribuir para maior absorção de energia na parede dos cascos.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer ao IME pelos recursos utilizados para a realização deste trabalho, bem como pelo financiamento do CNPq, CAPES e FAPERJ.

Referências

- [1] MCKITTRICK, J.; CHEN, P. Y.; TOMBOLATO, L.; NOVITSKAYA, E. E.; TRIM, M. W.; HIRATA, G. A.; OLEVSKY, E. A.; HORSTEMEYER, M. F.; MEYERS, M. A. Energy Absorbent Natural Materials and Bioinspired Design Strategies: A Review. *Materials Science Engineering C*, v. 30, p. 331-342, 2010.
- [2] MEYERS, M. A.; CHEN, P. Y. *Biological Materials Science*. Nova York: Cambridge University Press, 2014.
- [3] MCKITTRICK, J.; CHEN, P. Y.; BODDE, S. G.; YANG, W.; NOVITSKAYA, E. E.; MEYERS, M. A. The Structure, Functions, and Mechanical Properties of Keratin. *JOM*, v. 64, p. 449-468, 2012.
- [4] WANG, B.; YANG, W.; MCKITTRICK, J.; MEYERS, M. A. Keratin: Structure, Mechanical Properties, Occurrence in Biological Organisms, and Efforts at Bioinspiration. *Progress in Materials Science*, v. 76, p. 229-318, 2016.
- [5] LAZARUS, B. S.; VELASCO-HOGAN, A.; GÓMEZ-DEL RÍO, T.; MEYERS, M. A.; JASIUK, I. A Review of Impact Resistant Biological and Bioinspired Materials and Structures. *Journal of Materials Research and Technology*. v. 9, p. 15705-15738, 2020
- [6] FEUGHELMAN, M. *Mechanical Properties and Structure of Alpha-Keratin Fibres: Wool, Human Hair and Related Fibres*. Sydney: UNSW Press, 1997.

- [7] FRASER, R. D.; MACRAE, T. P. Molecular Structure and Mechanical Properties of Keratins. Symposia of the Society for Experimental Biology, v. 34, p. 211-246, 1980.
- [8] FRASER, R. D. B.; MACRAE, T. P.; ROGERS, G. E. Keratins: Their Composition, Structure and Biosynthesis, Charles C. Thomas. Springfield: [S. n], 1972.
- [9] BERTRAM, J. E.; GOSLINE, J. M. Functional Design of Horse Hoof Keratin: The Modulation of Mechanical Properties through Hydration Effects. The Journal of Experimental Biology, v. 130, p. 121-136, 1987.
- [10] FEUGHELMAN, M.; ROBINSON, M. S. The Relationship Between Some Mechanical Properties of Single Wool Fibers and Relative Humidity. Textile Research Journal, v. 37, p. 441-446, 1967.
- [11] HUANG, W.; YARAGHI, N. A.; YANG, W.; VELAZQUEZ-OLIVERA, A., LI, Z.; RITCHIE, R. O.; KISAILUS, D.; STOVER, S. M., MCKITTRICK, J. A Natural Energy Absorbent Polymer Composite: The Equine Hoof Wall. Acta Biomaterialia, v. 90, p. 267-277, 2019.
- [12] TOMBOLATO, L.; NOVITSKAYA, E. E.; CHEN, P. Y.; SHEPPARD, F. A.; MCKITTRICK, J. Microstructure, Elastic Properties and Deformation Mechanisms of Horn Keratin. Acta Biomaterialia, v. 6, p. 319-330, 2010.
- [13] ZHANG, Q.; BIN, Li, C.; PAN, Y. T.; SHAN, G. H.; CAO, P.; HE, J.; LIN, Z. S.; AO, N. J.; HUANG, Y. X. Microstructure and Mechanical Properties of Horns Derived from Three Domestic Bovines. Materials Science and Engineering C, v. 33, p. 5036-5043, 2013.
- [14] WANG, B.; ZHOU, B.; ZHANG, X.; WANG, B. Microstructure and Mechanical Properties of an Alpha Keratin Bovine Hoof Wall. Journal of Mechanical Behavior of Biomedical Materials, v. 104, 103689, 2020.
- [15] CLARK, C.; PETRIE, L. Fracture Toughness of Bovine Claw Horn from Cattle with and without Vertical Fissures. The Veterinary Journal, v. 173, p. 541-547, 2007.
- [16] BAILLIE, C.; SOUTHAM, C.; BUXTON, A.; PAVAN, P. Structure and Properties of Bovine Hoof Horn. Advanced Composites Letters. Journal, v. 9, 2000.
- [17] ASTM D570-98 Standard Test Method for Water Absorption of Plastics, 2018.
- [18] WU, M.; SHEN, S.; YANG, X.; TANG, R. Preparation and Study on the Structure of Keratin/PVA Membrane Containing Wool Fibers. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, v. 254, 2017.
- [19] VALKOV, A.; ZINIGRAD, M.; SOBOLEV, A.; NISNEVITCH, M. Keratin Biomembranes as a Model for Studying Onychomycosis. International Journal Molecular Science, v. 21, 2020.
- [20] KASAPI, M. A.; GOSLINE, J. M. Exploring the Possible Functions of Equine Hoof Wall Tubules. Equine Veterinary Journal, v. 30, p. 10-14, 2010.
- [21] KITCHENER, A. Effect of Water on the Linear Viscoelasticity of Horn Sheath Keratin. Journal Mater Science Lettering, v. 6, p. 321-322, 1987.
- [22] COLLINS, S. N.; COPE, B. C.; HOPEGOOD, L., LATHAM, R. J.; LINFORD, R. G. Stiffness as a Function of Moisture Content in Natural Materials : Characterisation of Hoof Horn Samples. Journal Mater Science, v. 33, p. 5185-5191, 1998.
- [23] FRASER, R. D. B.; MACRAE, T. P. The Structure of α -Keratin. Polymer (Guildf), v. 14, p. 61-67, 1973.
- [24] KUI, H.; LIU, X.; LIU, J.; LIANG, W.; ZHANG, S.; QIAN, Z.; REN, L. The Passive Contact Stability of Blue Sheep Hoof Based on Structure, Mechanical Properties, and Surface Morphology. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, v. 8, p. 1-16, 2020.
- [25] HUANG, W. Impact Resistant and Energy Absorbent Natural Keratin Materials: Horns and Hooves: [S. n.], 2018.
- [26] PARKER, F. S. Amides and Amines. In Applications of Infrared Spectroscopy in Biochemistry, Biology, and Medicine. Boston: Springer, 1971. p. 165-172.
- [27] KUMAR, S. L.; ANANDHAVELU, S.; SWATHY, M. Preparation and Characterization of Goat Hoof Keratin/ Gelatin/Sodium Alginate Base Biofilm for Tissue Engineering Application. Integrated Ferroelectrics, v. 202, p. 1-12, 2019.
- [28] VERMUNT, J. J.; GREENOUGH, P. R. Structural Characteristics of the Bovine Claw: Horn Growth and Wear, Horn Hardness and Claw Conformation. British Veterinary Journal, v. 151, p. 157-180, 1995.
- [29] FRANCK, A.; COCQUYT, G.; SIMOENS, P.; DE BELIE, N. Biomechanical Properties of Bovine Claw Horn. Biosystem Engineer, v. 93, p. 459-467, 2006.
- [30] WANG, B.; HUANG, Y.; ZHOU, B.; LI, W.; CHEN, H. Nanoindentation and Hierarchy Structure of the Bovine Hoof Wall. Materials (Basel), v. 14, 2021.
- [31] ASSIS, B. M.; SILVA, L. A. F.; LIMA, C. R. O.; GOUVEIA, R. F.; VULCANI, V. A. S.; DE SANT'ANA, F. J. F.; RABELO, R. E. Microstructure and Hardness of Buffalo's Hoofs. Anatomia Histologia Embryologia, v. 46, p. 439-445, 2017.