



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS CERRO LARGO – RS
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – LICENCIATURA**

BERNARDETE DA SILVA BERNARDO

**PRODUÇÃO DE PROTEASES E HIDROLISADOS PROTEICOS
BIOATIVOS ATRAVÉS DA BIOCONVERSÃO DE FARINHA DE
PENAS**

CERRO LARGO

2018

BERNARDETE DA SILVA BERNARDO

**PRODUÇÃO DE PROTEASES E HIDROLISADOS PROTEICOS
BIOATIVOS ATRAVÉS DA BIOCONVERSÃO DE FARINHA DE
PENAS**

Trabalho de conclusão do curso de graduação
apresentado como requisito para obtenção do
grau de Licenciatura em Ciências Biológicas da
Universidade Federal da Fronteira Sul

Orientador: Prof. Dr. Daniel Joner Daroit
Coorientadora: MSc. Kelly Callegaro

CERRO LARGO

2018

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Bernardo, Bernardete da Silva

Produção de proteases e hidrolisados proteicos bioativos através da bioconversão de farinha de penas / Bernardete da Silva Bernardo. -- 2018.

33 f.:il.

Orientador: Doutor Daniel Joner Daroit.

Co-orientador: Mestra Kelly Callegaro .

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de Ciências Biológicas-Licenciatura , Cerro Largo, RS , 2018.

1. Penas. 2. Bacillus. 3. Biodegradação . 4. Potencial antioxidante. 5. Atividade antidiabética . I. Daroit, Daniel Joner, orient. II. , Kelly Callegaro, co-orient. III. Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

BERNARDETE DA SILVA BERNARDO

PRODUÇÃO DE PROTEASES E HIDROLISADOS PROTEICOS BIOATIVOS
ATRAVÉS DA BIOCONVERSÃO DE FARINHA DE PENAS

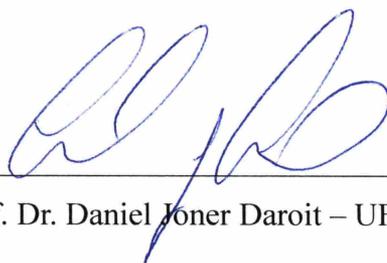
Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção de grau de Licenciada em Ciências Biológicas da Universidade Federal da Fronteira Sul.

Orientador: Dr. Daniel Joner Droit
Coorientadora: Msc. Kelly Callegaro

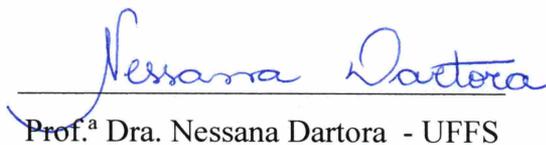
Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em:

__05__ / __12__ / __2018__

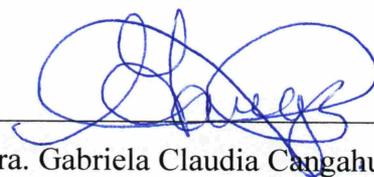
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Daniel Joner Daroit – UFFS



Prof.ª Dra. Nessana Dartora - UFFS



Prof.ª Dra. Gabriela Claudia Cangahuala Inocente - UFFS

Dedico este trabalho ao meu filho Eliseo, que é o meu alicerce e luz na minha vida. Aos meus pais Sr. José Bernardo (*in memoriam*) e Severina Bernardo, que mesmo em toda simplicidade de vida, sempre me incentivaram e me apoiaram a seguir o caminho dos estudos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e professor Dr. Daniel Joner Daroit, pela imensurável orientação, no qual confiou em mim a realização deste trabalho. Por ter dado a oportunidade das rotinas laboratoriais, em que agregou grande bagagem em minha vida acadêmica, pela paciência que teve em ensinar-me cada passo da pesquisa, e por ser um grande exemplo de amigo e professor a ser seguido.

À Universidade Federal da Fronteira Sul.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo custeio desta pesquisa.

A todos os professores e técnicos envolvidos para a minha formação universitária.

À mestre e amiga Kelly Callegaro por estar comigo, orientando-me pacientemente cada procedimento e aconselhando-me nos detalhes deste trabalho.

Ao colega Rodrigo, por estar sempre disposto em me ajudar nesta caminhada.

A toda equipe do laboratório de microbiologia.

À minha família, por todo o apoio, compreensão e incentivo para seguir adiante.

À Esbenis Cunha e ao Deck Cunha por dedicarem o seu tempo cuidando do meu filho em minha ausência, permitindo assim, que eu pudesse continuar meus estudos.

Ao meu namorado Marcelo, o qual me incentivou em todo o momento da graduação.

A todos meus amigos que não foram citados, mas que tornaram esta caminhada mais leve e mais harmoniosa.

Eu agradeço.

"We must, however, acknowledge, as it seems to me, that man with all his noble qualities... still bears in his bodily frame the indelible stamp of his lowly origin."

Charles Darwin

RESUMO

Penas estão entre os principais resíduos gerados pela indústria avícola. Estes resíduos são usualmente convertidos em farinha de penas (FP), que possui uso limitado em rações para animais devido ao seu baixo valor nutricional e baixa digestibilidade. Mediante a isto, usos alternativos da FP vêm sendo investigados no contexto da biotecnologia para obter produtos de valor agregado. Neste estudo, a bactéria *Bacillus* sp. CL33A foi investigada quanto à capacidade de degradar FP, produzir proteases e hidrolisados de FP (HFP) com capacidades antioxidantes e antidiabética, durante cultivos em meio contendo FP. *Bacillus* sp. CL33A apresentou capacidade de utilizar FP como único substrato orgânico para seu crescimento, tendo degradado 76% e 91% da FP após 3 e 7 dias de cultivo, respectivamente. A máxima atividade de proteases foi detectada no 4º dia de cultivo, alcançando 461 U/mL. A concentração de proteínas solúveis foi elevada durante os cultivos, atingindo 5,6 mg/mL após 5 dias. Quanto ao potencial antioxidante, avaliado por meio da captura dos radicais 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-ácido sulfônico (ABTS) e 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), HFPs obtidos aos 4 dias de cultivos apresentaram máxima captura de 76% e 63%, respectivamente, mantendo-se valores similares em maiores tempos de cultivo. A capacidade quelante de Fe²⁺ dos HFP atingiu 28% e 47% após 4 e 7 dias de cultivo, respectivamente. O poder redutor dos HFP também foi incrementado durante os cultivos, atingindo valores máximos no 5º dia. A atividade antidiabética foi avaliada pela capacidade dos HFPs em inibir a enzima dipeptidil peptidase IV (DPP IV). Os HFPs obtidos após 3 dias de cultivo inibiram a atividade da DPP IV em 58%. A bioconversão microbiana de FP, um substrato abundante e de baixo custo, pode ser utilizada para a obtenção simultânea de proteases e hidrolisados proteicos bioativos, que devem ser explorados quanto às suas potenciais aplicações.

Palavras-chave: Penas. *Bacillus*. Biodegradação. Potencial antioxidante. Atividade antidiabética.

ABSTRACT

Feathers are among the major wastes generated by the poultry industry. These residues are usually converted into feather meal (FP), which has limited use in animal feed due to its low nutritional value and digestibility. Hence, alternative uses of FP have been investigated in the context of biotechnology, to obtain value-added products. In this study, the bacterium *Bacillus* sp. CL33A was investigated for the ability to degrade FP, to produce proteases and hydrolysates of FP (HFP) with antioxidant and antidiabetic abilities, during cultivations in medium containing FP. *Bacillus* sp. CL33A displayed the capacity to use FP as the only organic growth substrate, degrading 76% and 91% of FP after 3 and 7 days of cultivation, respectively. The maximum protease activity was detected on the 4th day of cultivation, reaching 461 U/mL. The concentration of soluble proteins was increased during cultivations, reaching 5.6 mg/mL after 5 days. As for the antioxidant potential, evaluated through the scavenging of 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulphonic acid (ABTS) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radicals, HFPs obtained after 4 days of cultivation presented maximum scavenging of 76% and 63%, respectively, with similar values at higher culture times. The Fe²⁺ chelating capacity of HFP reached 28% and 47% after 4 and 7 days of cultivation, respectively. The reducing power of HFPs was also increased during the cultivations, reaching maximum values on the 5th day. The antidiabetic activity was evaluated by the capacity of HFPs to inhibit the enzyme dipeptidyl peptidase IV (DPP IV). HFPs obtained at 3 days of cultivation inhibited DPP IV activity by 58%. Microbial bioconversion of FP, an abundant and low-cost substrate, can be used to simultaneously obtain proteases and bioactive protein hydrolysates, which should be exploited for their potential applications.

Keywords: Feathers. *Bacillus*. Biodegradation. Antioxidant potential. Antidiabetic activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Massa residual da farinha de penas (FP; %) durante cultivos com <i>Bacillus</i> sp. CL33A em caldo farinha de penas (10 g/L de FP).	18
Figura 2. Produção de proteases por <i>Bacillus</i> sp. CL33A durante cultivos em caldo farinha de penas (10 g/L de FP).	19
Figura 3. Concentração de proteínas solúveis durante cultivos de <i>Bacillus</i> sp. CL33A realizados em caldo farinha de penas (10 g/L de FP).	20
Figura 4. Captura (%) dos radicais ABTS (○) e DPPH (●) por hidrolisados de farinha de penas produzidos durante cultivos de <i>Bacillus</i> sp. CL33A em caldo farinha pena (10 g/L de FP).	21
Figura 5. Capacidade quelante de Fe ²⁺ (●; %) e poder redutor (○; Abs a 700 nm) de hidrolisados de farinha de penas produzidos durante cultivos de <i>Bacillus</i> sp. CL33A em caldo farinha pena (10 g/L de FP).	23
Figura 6. Inibição da DPP IV (%) por hidrolisados de farinha de penas produzidos durante cultivos de <i>Bacillus</i> sp. CL33A em caldo farinha pena (10 g/L de FP).	25

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 MATERIAL E MÉTODOS	14
2.1 Cultivos submersos para a obtenção dos hidrolisados de farinha de penas	14
2.2 Determinação da produção de proteases	14
2.3 Determinação da concentração de proteína solúvel	15
2.4 Potencial antioxidante	15
<i>2.4.1 Atividade sequestrante do radical 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS)</i>	15
<i>2.4.2 Atividade sequestrante do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)</i>	16
<i>2.4.3 Poder redutor</i>	16
<i>2.4.4 Atividade quelante de ferro</i>	16
2.5 Potencial antidiabético: inibição da enzima dipeptidil peptidase IV (DPP IV)	17
2.6 Análise dos dados	17
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
3.1 Degradação de FP por <i>Bacillus</i> sp. CL33A	18
3.2 Atividade proteolítica	19
3.3 Conteúdo de proteína solúvel durante cultivos em CFP	20
3.4 Bioatividades dos hidrolisados de FP (HFP)	21
<i>3.4.1 Atividades antioxidantes</i>	21
<i>3.4.2 Potencial antidiabético</i>	25
4 CONCLUSÕES	18
REFERÊNCIAS	28

1 INTRODUÇÃO

A população da Terra ultrapassa sete bilhões de pessoas. Tornando-se necessário o incremento da produtividade agropecuária, a qual sustenta a disponibilidade de alimentos e, portanto, apresenta enorme importância. No cenário atual, a avicultura apresenta forte desenvolvimento no que tange à produção e abate de aves, para atender à crescente demanda pelo consumo de proteínas animais para a alimentação humana.

No ano de 2017, o Brasil ocupou o segundo lugar na produção mundial de carne de frango, ficando atrás apenas dos Estados Unidos, e o primeiro lugar na exportação mundial de carne de frango. Sendo assim, o Brasil representa uma das maiores nações produtoras de carne de frango (EMBRAPA, 2018).

Enorme quantidade de resíduos sólidos é oriunda do abate das aves. Dentre estes resíduos estão as penas, apêndices epidérmicos ricos em queratinas. As queratinas são proteínas estruturais fibrosas, estáveis e insolúveis devido à abundância de ligações intra e intermoleculares, como pontes dissulfeto e interações hidrofóbicas. Estas características fornecem às penas recalcitrância, dificultando assim a sua degradação (BRANDELLI, 2008). Estimativa global da quantidade de resíduos queratinosos gerados no processamento de aves de corte indica que cinco milhões de toneladas de penas são geradas anualmente (POOLE et al., 2009). Logo, associada à expansão da indústria avícola, a correta destinação dos resíduos de processamento representa um desafio para a sustentabilidade (KIST e al., 2009; BRANDELLI et al., 2015).

Dentre as estratégias empregadas para a destinação de rejeitos sólidos de abatedouros de aves, como penas, vísceras, sangue, ossos, entre outros, se destaca a fabricação de produtos denominados farinhas, através de processos de cocção sob pressão e moagem. No Brasil, milhões de toneladas de farinhas de subprodutos são produzidas anualmente (NUNES, 2003), utilizadas como ingredientes em rações para animais (PICCHI, 1994). Contudo, a farinha de penas apresenta baixa digestibilidade, diminuído valor biológico e baixa eficiência nutricional devido à recalcitrância das queratinas das penas frente à ação das enzimas digestivas animais. Além disso, o tratamento térmico empregado destrói aminoácidos essenciais (ONIFADE et al., 1998).

Mesmo com a difícil degradação das queratinas, microrganismos queratinolíticos, produtores de proteases capazes de hidrolisar estas proteínas, são encontrados em diversos ecossistemas. Embora o entendimento básico sobre a

diversidade fisiológica bacteriana seja ainda amplamente limitado a métodos que dependem de cultivos microbianos (GIOVANNI; RAPPÉ, 2000), estudos vêm sendo desenvolvidos com microorganismos que comprovam a sua eficácia como degradadores de resíduos queratinosos (GUPTA; RAMNANI, 2006). A capacidade de fungos (ANBU et al., 2006) e de bactérias, particularmente espécies de *Bacillus* (FAKHFAKH et al., 2011), em degradar penas, vem sendo descrita. Contudo, investigações demonstram que bactérias têm maior eficiência na decomposição destes materiais (LUCAS, 2013).

Neste sentido, há uma crescente utilização da biotecnologia, que emprega organismos vivos e seus elementos metabólicos para a produção e melhoramento de produtos, tendo a sua aplicabilidade nas áreas da indústria, saúde, agricultura, meio ambiente, energia, alimentação, pecuária, entre outras (PEREIRA et al., 2008). Assim, a farinha de penas pode ser considerada como um insumo rico em proteínas que, através de tecnologias adequadas de conversão, representa um matéria-prima abundante e de baixo custo para a obtenção de produtos úteis (ONIFADE et al., 1998).

Estudos demonstram a possibilidade de produção de enzimas microbianas, especialmente proteases, através da degradação das penas e farinha de penas por microrganismos queratinolíticos. Proteases microbianas são importantes enzimas hidrolíticas amplamente utilizadas na indústria de alimentos, rações, detergentes, couros e na indústria farmacêutica, sendo responsáveis por aproximadamente 60% das vendas globais de enzimas (HIDALGO et al., 2012). Considerando o elevado custo dos substratos utilizados para a produção de proteases microbianas em escala comercial, há a busca por substratos que possam oferecer um custo menor para a produção de enzimas (KASANA et al., 2011).

De fato, o principal objetivo do uso de penas e farinha de penas em processos microbianos é a obtenção de proteases (DAROIT, BRANDELLI, 2014). No entanto, estudos vêm demonstrando que os hidrolisados proteicos resultantes da bioconversão de materiais queratinosos também possuem diversas aplicações. Estes hidrolisados proteicos poderiam ser utilizados como fertilizantes, pois são ricos em nitrogênio, representando uma alternativa mais econômica e ambientalmente mais segura para a agricultura (ICHIDA et al., 2001; BOSE et al., 2014). Também vêm sendo investigadas potenciais aplicações dos hidrolisados de penas como ingredientes de rações para animais (MACIEL et al., 2017) e para a fabricação de bioplásticos resistentes e biodegradáveis (KOTA et al., 2014). Hidrolisados proteicos e peptídeos obtidos através

da bioconversão de penas vêm sendo investigados como ingredientes em xampus e condicionadores, protegendo as estruturas capilares (VILLA, 2008).

Hidrolisados proteicos e peptídeos antioxidantes vêm sendo investigados para diminuir a formação e a reatividade de radicais livres (PHELAN et al., 2009). Os radicais livres são átomos ou moléculas produzidas durante os processos metabólicos. As fontes de radicais livres são as organelas citoplasmáticas que metabolizam o oxigênio, o nitrogênio e o cloro, gerando grande quantidade de metabólitos. Estes radicais podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação (MENDEZ, 1997).

Em concentrações adequadas, os radicais livres atuam como defesa contra vírus, fungos e bactérias mantendo a homeostase do organismo (FERREIRA et al., 1997; BARREIROS et al., 2006), visto que exercem atividades mediadoras para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, constituindo importantes funções no metabolismo (MENDEZ, 1997). No entanto, radicais como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxilas ($\cdot OH$) e lipoperoxilas (LOO^{\cdot}) são caracterizados por possuir elétrons não pareados, o que os torna altamente reativos, e por isto alteram a homeostase celular causando danos muitas vezes irreversíveis (SILVA, 2008). Assim, o acúmulo de radicais livres no organismo está associado ao estresse oxidativo, gerando uma série de danos às células e suas moléculas e estruturas, que por sua vez, está relacionado ao envelhecimento e, ao desenvolvimento de diversas enfermidades crônicas como câncer e doenças cardiovasculares (FERRARI e SILVA, 2008).

Assim, há crescente investigação para o combate aos efeitos deletérios do estresse oxidativo em humanos e animais, de modo a reduzir prováveis danos celulares e doenças associadas; ainda, a peroxidação lipídica causa diminuição da qualidade e da segurança dos alimentos. Neste sentido, o potencial antioxidante de hidrolisados proteicos e peptídeos obtidos a partir da hidrólise de proteínas pode contrapor os efeitos nocivos do estresse oxidativo e da peroxidação lipídica (HAQUE; CHAND, 2008; PHELAN et al., 2009), tendo seu uso postulado na medicina, produtos farmacêuticos, nutrição humana, indústrias de alimentos e cosméticos (BUENO et al., 2009). A caracterização da capacidade antioxidante de moléculas e amostras é geralmente realizada através de ensaios *in vitro*, sendo que a captura de radicais livres, capacidade quelante de Fe^{2+} e poder redutor estão entre os ensaios mais utilizados (ALAM et al., 2013).

A diabetes tipo 2 é uma desordem metabólica onde há a diminuição da secreção de insulina pelas células β e resistência à insulina nos tecidos. Esta condição está associada ao desenvolvimento de diversas complicações, incluindo a hipertensão e doenças cardiovasculares. Considerando que aproximadamente 370 milhões de pessoas possuem diabetes tipo 2 e que estes números apresentam tendência de aumento, diferentes estratégias vêm sendo investigadas para tratar de forma adequada a hiperglicemia (KAHN et al., 2014).

Os hormônios intestinais peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1) e o polipeptídeo inibitório gástrico (GIP) são liberados após a refeição e aumentam a secreção de insulina pelas células β do pâncreas (FEHMANN et al., 1995). O GLP-1 também mostra outros efeitos para a homeostase da glicose, inibindo a secreção de glucagon, postergando o esvaziamento gástrico, ao passo que estimula a biossíntese de insulina, resultando simultaneamente em potencial aumento na ação da insulina periférica tornando-se antidiabetogênico (NAUCK et al., 1997).

Na diabetes tipo 2, embora o efeito do GLP-1 seja mantido, tanto o GLP-1 quanto o GIP são rapidamente deteriorados pela enzima dipeptidil peptidase IV (DPP IV), encontrada em superfícies celulares e circulante no plasma, fazendo com que estes hormônios tenham uma curta meia-vida na circulação (DEACON et al., 1995). Neste sentido, inibidores da DPP IV estão entre os tratamentos da diabetes tipo 2, para aumentar o tempo circulante do GLP-1 e, com isso, potencializar o efeito insulínico deste hormônio. Ainda, inibidores da DPP-IV melhoram a tolerância à glicose e a função das células das ilhotas pancreáticas em modelos animais de diabetes tipo 2 e em pacientes com diabetes tipo 2 (LAMBEIR, 2003). Hidrolisados proteicos e peptídeos vêm sendo caracterizados como inibidores da DPPIV (POWER et al., 2014).

Embora o foco de pesquisas sobre hidrolisados e peptídeos bioativos seja sua obtenção a partir de proteínas alimentares (HAQUE; CHAND, 2008; PHELAN et al., 2009), crescente atenção vem sendo dedicada à produção e caracterização dos potenciais bioativos de hidrolisados obtidos a partir de proteínas residuais e/ou subprodutos da agroindústria (LEMES et al., 2016a). Contudo, o potencial bioativo de hidrolisados de penas e farinha de penas é descrito de forma escassa, representando uma área promissora para pesquisa e desenvolvimento (SINKIEWICZ et al., 2018).

Neste contexto, o potencial proteolítico da bactéria *Bacillus* sp. CL33A, uma linhagem mesofílica isolada a partir de local com descarte de penas no Sul do Brasil, foi previamente caracterizado (DE OLIVEIRA et al., 2016). Desta forma, o presente

trabalho visou avaliar a produção de proteases e o potencial bioativo de hidrolisados proteicos produzidos por esta bactéria durante cultivos submersos contendo farinha de penas como única fonte de carbonos, nitrogênio, enxofre e energia para o crescimento bacteriano.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cultivos submersos para a obtenção dos hidrolisados de farinha de penas

Para a bioconversão de farinha de penas (FP) em cultivos submersos foi utilizada a bactéria *Bacillus* sp. CL33A e o meio de cultura denominado Caldo Farinha de Pena (CFP), composto por (g/L): K_2HPO_4 , 0,3; KH_2PO_4 , 0,4; NaCl, 0,5; FP, 10,0; pH inicial 7,5. Previamente à inoculação, os meios foram esterilizados em autoclave (121 °C, 15 min). Frascos Erlenmeyer contendo 50 mL de CFP foram inoculados com suspensão da bactéria (1 unidade de absorbância a 600nm), e incubados a 30 °C em estufa com agitação orbital (125 rpm) por até 7 dias. Em tempos de cultivo pré-estabelecidos, Erlenmeyer foram retirados em duplicatas e seu conteúdo filtrado através de papel filtro para determinação da massa residual da FP após secagem (60 °C) até massa constante. Os filtrados foram centrifugados ($10.000 \times g$ por 10 min) e os sobrenadantes coletados para as investigações subsequentes.

2.2 Determinação da produção de proteases

A produção de proteases pela bactéria durante os cultivos foi avaliada em triplicatas, utilizando azocaseína como substrato enzimático. Os ensaios consistiram em 100 μ L de tampão Tris-HCl (0,1 M; pH 8,0), 300 μ L de solução de azocaseína (10 g/L; preparada no mesmo tampão) e 100 μ L do sobrenadante dos cultivos, adequadamente diluídos em água destilada. As reações foram realizadas a 55 °C, por 30 min, e finalizadas pela adição de solução de ácido tricloroacético (100 g/L). Após centrifugação, 800 μ L dos sobrenadantes da reação foram coletados e adicionados a 200 μ L de solução de NaOH (1,8 M). A absorbância desta mistura foi avaliada em espectrofotômetro a 420 nm, e uma unidade de atividade (U) foi considerada como a quantidade de enzima resultando no aumento de 0,01 unidade de absorbância nas condições do ensaio (CORRÊA et al., 2010).

Os sobrenadantes dos cultivos foram então tratados termicamente (100 °C, por 15 min) para inativar enzimas bacterianas, sendo então denominados de hidrolisados de farinha de pena (HFP).

2.3 Determinação da concentração de proteína solúvel

Os HFP foram avaliados quanto à concentração de proteínas solúveis através do método descrito por Lowry et al. (1951), utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu. Para tanto, foram utilizados dois reagentes (A e B). O reagente A continha uma combinação de 50 mL de solução de NaOH (0,1 M) contendo Na₂CO₃ (20 g/L) e 1 mL de solução contendo sulfato de cobre (5 g/L) e tartarato de sódio e potássio (10 g/L); o reagente B foi formulado pela adição de reagente de Folin-Ciocalteu e água destilada na proporção 1:1. Em tubos de ensaio, 100 µL de HFP convenientemente diluído em água destilada foram adicionados a 2,5 mL do reagente A, e esta mistura foi incubada por 15 min em temperatura ambiente, no escuro. Após, 300 µL do reagente B foram adicionados e, seguindo-se incubação por 30 min em temperatura ambiente, no escuro, a absorbância foi mensurada a 750 nm. Curva padrão foi preparada com albumina sérica bovina, com concentrações de 0 a 1 mg/mL.

2.4 Potencial antioxidante

A atividade antioxidante dos HPFs obtidos foi avaliada por diferentes métodos, realizados em triplicatas.

2.4.1 Atividade sequestrante do radical 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS)

Este método baseia-se na captura do radical ABTS, mensurado através do ensaio proposto por Re et al. (1999). Solução do radical ABTS foi preparada através da reação de 5 mL de solução de ABTS (7 mM) com 88 µL de solução de K₂S₂O₈ (140 mM). Esta solução permaneceu no escuro, em temperatura ambiente, por 16 h antes do uso. Para os ensaios, a solução do radical ABTS foi diluída em tampão fosfato salino (PBS; 5 mM, pH 7,4) até atingir absorbância (Abs) de 0,700 (± 0,02) a 734 nm. Amostras dos hidrolisados (10 µL) foram adicionadas a 1 mL da solução diluída de ABTS e a Abs a 734 nm foi mensurada após 10 min. Controles negativos corresponderam ao uso de água destilada no lugar da amostra. Os resultados foram expressos como:

$$\text{Porcentagem de captura (\%)} = [(Abs_{\text{controle}} - Abs_{\text{amostra}}) / Abs_{\text{controle}}] \times 100$$

2.4.2 Atividade sequestrante do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

Este método foi realizado conforme proposto por Brand-Williams et al. (1995), baseado na captura do radical DPPH por antioxidantes, que resulta na diminuição da Abs a 517 nm. Solução metanólica de DPPH (60 µM) foi preparada e, em ambiente escuro, alíquota dos hidrolisados (1 mL) foi adicionada a tubos de ensaio contendo 3,9 mL da solução de DPPH. Após homogeneização, e seguindo-se incubação por 60 min em temperatura ambiente, a atividade de captura do radical foi mensurada a 517 nm. Controles foram realizados com a adição de água destilada no lugar da amostra. Resultados foram expressos como:

$$\text{Porcentagem de captura (\%)} = [(Abs_{\text{controle}} - Abs_{\text{amostra}}) / Abs_{\text{controle}}] \times 100$$

2.4.3 Poder redutor

A avaliação foi realizada conforme descrito previamente (ZHU et al., 2006). Amostras dos hidrolisados (1 mL) foram adicionadas a 2,5 mL de tampão fosfato (0,2 M; pH 6,6) e misturadas a 2,5 mL de solução de ferricianeto de potássio (10 g/L). Após incubação a 50 °C por 30 min, 2,5 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA; 100 g/L) foram adicionados e a mistura centrifugada (3.000 × g por 10 min). O sobrenadante (2,5 mL) foi misturado a 2,5 mL de água destilada e, após adição de 0,5 mL de solução de FeCl₃ (1 g/L), a Abs foi mensurada a 700 nm. Maiores valores de absorbância indicaram maior poder redutor. Como controle negativo foi utilizada água destilada no lugar da amostra.

2.4.4 Atividade quelante de ferro

A atividade quelante de Fe²⁺ foi mensurada utilizando como base o método descrito por Chang et al. (2007). Alíquota dos hidrolisados (100 µL) foi misturada a 3,7 mL de água destilada, 0,1 mL de FeSO₄ (2 mM) e 0,2 mL de ferrozina (3-(2-piridil)-5,6-bis-(4-ácido fenil sulfônico)-1,2,4-triazina; 5 mM). Após 10 min, a Abs foi mensurada a 562 nm. Controles negativos foram confeccionados com água destilada no lugar da amostra. Os resultados foram expressos como:

$$\text{Atividade quelante (\%)} = [(Abs_{\text{controle}} - Abs_{\text{amostra}}) / Abs_{\text{controle}}] \times 100$$

2.5 Potencial antidiabético: inibição da enzima dipeptidil peptidase IV (DPP IV)

A capacidade antidiabética foi avaliada *in vitro* pela habilidade dos HFP em inibir a atividade da DPP IV frente ao substrato Gli-Pro-*p*-nitroanilida (KOJIMA et al., 1980). Para tanto, HFP (25 µL) foi adicionado a 25 µL da solução Gli-Pro-*p*-nitroanilide (2 mM, preparado em tampão Tris-HCl, 50 mM, pH 7,6) e esta mistura foi pré-incubada a 37 °C por 10 min. Subsequente, 50 µL da enzima DPP IV (0,01 U/mL, diluída em tampão Tris-HCl) foram adicionados para iniciar as reações. Depois da incubação (37 °C por 60 min), as reações foram finalizadas pela adição de 100 µL de tampão acetato de sódio (1 M, pH 4,0). A absorbância foi então mensurada a 405 nm. Os resultados de inibição foram calculados como:

$$\text{Inibição da DPP IV (\%)} = \{1 - [(A - B) / (C - D)]\} \times 100$$

onde A é a absorbância em ensaios com DPP IV, substrato, e HFP; B é a absorbância em reações contendo substrato e HFP, sem DPP IV (substituída por tampão); C é a absorbância em ensaios com DPP IV e o substrato, sem o HFP (substituído por água destilada); e D é a absorbância com o substrato, sem DPP IV e HFP (substituídos por tampão e água destilada, respectivamente). Os ensaios foram produzidos em triplicatas.

2.6 Análise dos dados

Os resultados dos experimentos foram utilizados para calcular médias e desvios-padrão. Comparações entre médias foram realizadas pelo teste de Tukey considerando-se o nível de significância de 5%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Degradação de FP por *Bacillus* sp. CL33A

Microrganismos queratinolíticos vêm sendo investigados quanto ao seu potencial para degradação de materiais ricos em queratina, que normalmente são subprodutos da indústria da carne, objetivando a reciclagem destes materiais e a obtenção de produtos com aplicação comercial e industrial (LASEKAN et al., 2013).

A determinação do percentual de massa seca de FP foi realizada durante os cultivos em CFP, para indicar a capacidade da bactéria em degradar este substrato. Foi possível observar que, até o 2º dia de cultivo, a degradação da FP foi praticamente nula (Figura 1). No entanto, 62% da massa inicial da FP foram degradados após 3 dias de cultivo, atingindo 92% de degradação depois de 7 dias (Figura 1).

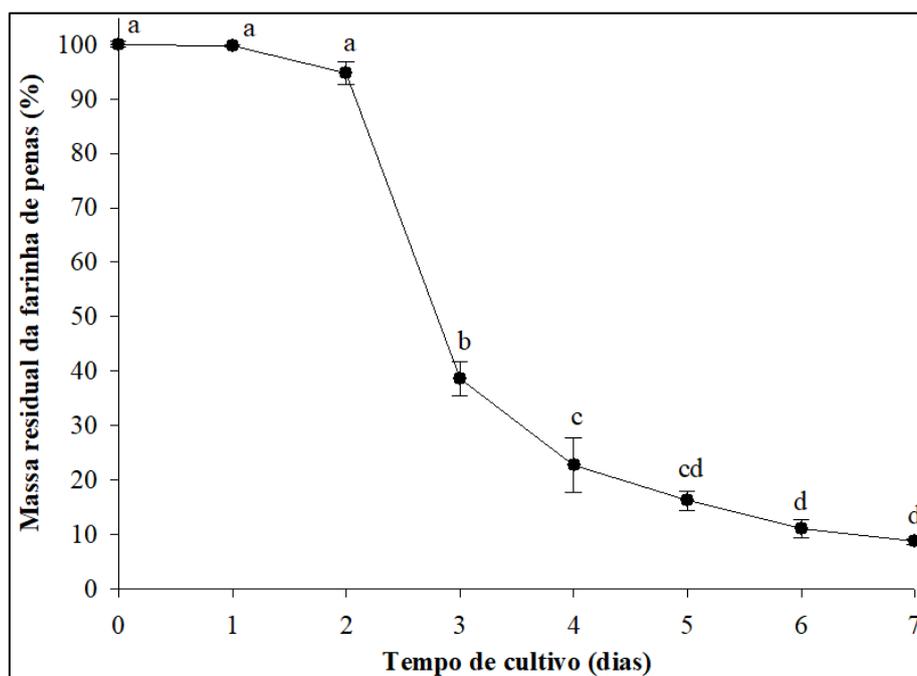


Figura 1. Massa residual da farinha de penas (FP; %) durante cultivos com *Bacillus* sp. CL33A em caldo farinha de penas (10 g/L de FP). Os resultados são a média \pm desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) em função do tempo de cultivo.

Comparativamente, 96% de degradação da FP foi observada após 7 dias de cultivo com *Bacillus pumilis* F3-4 (SON et al., 2008). Em uma investigação com

Bacillus sp. P7, 87% da FP foi degradada após 4 dias (CORRÊA et al., 2010), enquanto que *Bacillus subtilis* 1270, *Bacillus subtilis* 1273, e *Bacillus licheniformis* 1274 degradaram 63%, 70%, e 76% da FP depois de 7 dias de cultivo (MAZOTTO et al., 2011). Com base nestes resultados, a bactéria estudada pode ser considerada moderadamente eficiente para a degradação de FP.

3.2 Atividade proteolítica

Quanto à produção de proteases por *Bacillus* sp. CL33A, aumento foi detectado a partir do 2º dia de cultivo, atingindo pico após 4 dias de cultivo (461 U/mL), como mostrado na Figura 2. A queda da atividade de protease em tempos de cultivo mais longos pode ser resultado da indisponibilidade de FP no meio, da inibição da produção de proteases por retroalimentação, bem como a autólise, ou seja, a degradação de proteases por outras proteases (GHASEMI et al., 2012).

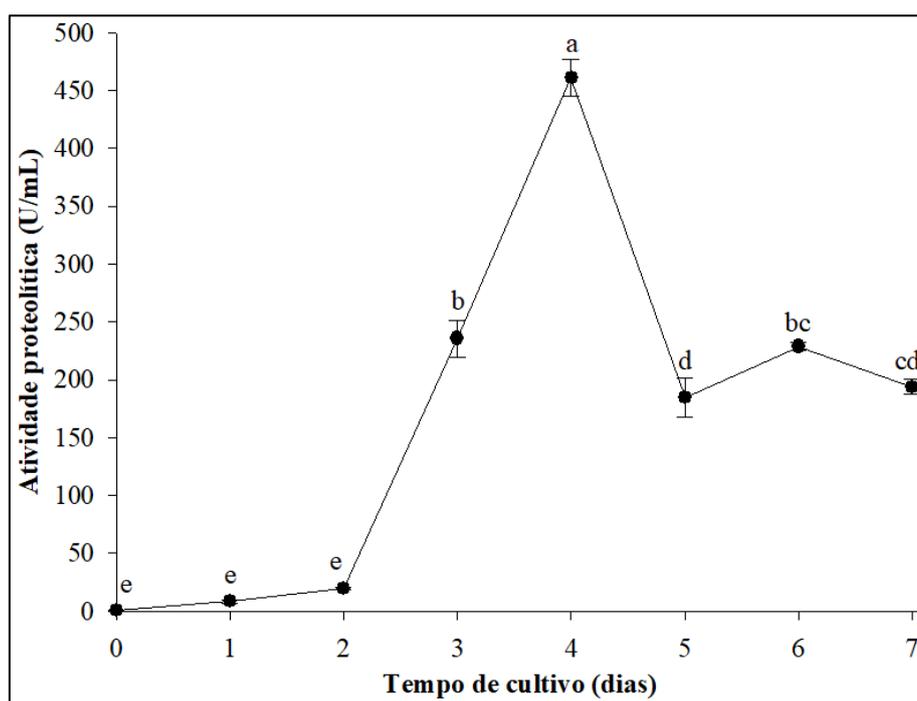


Figura 2. Produção de proteases por *Bacillus* sp. CL33A durante cultivos em caldo farinha de penas (10 g/L de FP). Os resultados são a média \pm desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) em função do tempo de cultivo.

Cultivos também realizados por 4 dias em meio contendo FP resultaram em maior produção de proteases por 4 linhagens de *Bacillus* (QUEIROGA et al., 2012). Em estudo com 5 bactérias queratinolíticas, a produção de proteases atingiu picos após 3 a 6 dias de cultivo, dependendo do isolado bacteriano (RIFFEL, BRANDELLI, 2006). Elevada produção de proteases por *Bacillus subtilis* FDS15 foi alcançada após 3 dias de cultivo em meio contendo FP (SEKAR et al., 2016).

No presente estudo, *Bacillus* sp. CL33A demonstrou atividade proteolítica utilizando apenas a FP para o seu desenvolvimento, sem a necessidade de adição de outros substratos orgânicos. Além de realizar a hidrólise de proteínas no meio para que as células absorvam e utilizem os produtos da hidrólise (SATINER, 2007), proteases produzidas por *Bacillus* estão entre as enzimas mais estudadas, por terem ampla utilização e aplicações industriais e comerciais (CONTESINI et al., 2018). Assim, o uso de substratos alternativos, como a FP, pode ser uma estratégia para diminuir os custos de produção destas proteases (DAROIT, BRANDELLI, 2014).

3.3 Conteúdo de proteína solúvel durante cultivos em CFP

Bactérias do gênero *Bacillus* são heterotróficas e, por isso precisam de materiais orgânicos para constituir sua biomassa e para produzir energia (MADIGAN et al., 2016). Considerando que a FP foi o único substrato orgânico no meio de cultura, e que a FP é constituída basicamente por proteínas (queratinas), a produção de proteases extracelulares é necessária para hidrolisar este substrato, resultando em peptídeos e aminoácidos que irão sustentar o crescimento da bactéria (VERMA et al., 2017).

Assim, como esperado, a degradação da FP por *Bacillus* sp. CL33A, mediada por proteases extracelulares, resultou na liberação de proteínas solúveis no meio (QUEIROGA et al., 2012). A partir do 2º dia de cultivo houve aumento na concentração de proteínas solúveis, que atingiu valores máximos de 5,6 mg/mL a partir do 5º dia (Figura 3).

Cultivos com três linhagens de *Bacillus* em meio contendo FP resultou em conteúdo de proteína solúvel de 3,9-4,4 mg/mL após 7 dias (MAZOTTO et al., 2011). Ferrareze et al. (2016) reportaram proteína solúvel de 5,7 mg/mL após 4 dias de cultivo com uma linhagem de *B. subtilis*. Por outro lado, após 7 dias de cultivo de *Bacillus pumilis* F3-4 em meio contendo FP, a concentração de proteínas solúveis foi de 1,8 mg/mL (SON et al., 2008). O acúmulo de proteínas solúveis indica sua liberação em

maior quantidade do que a necessária para a bactéria. O conteúdo de proteínas solúveis no 6º e 7º dias de cultivo permaneceu praticamente constante, indicando a indisponibilidade da FP (BACH et al., 2011).

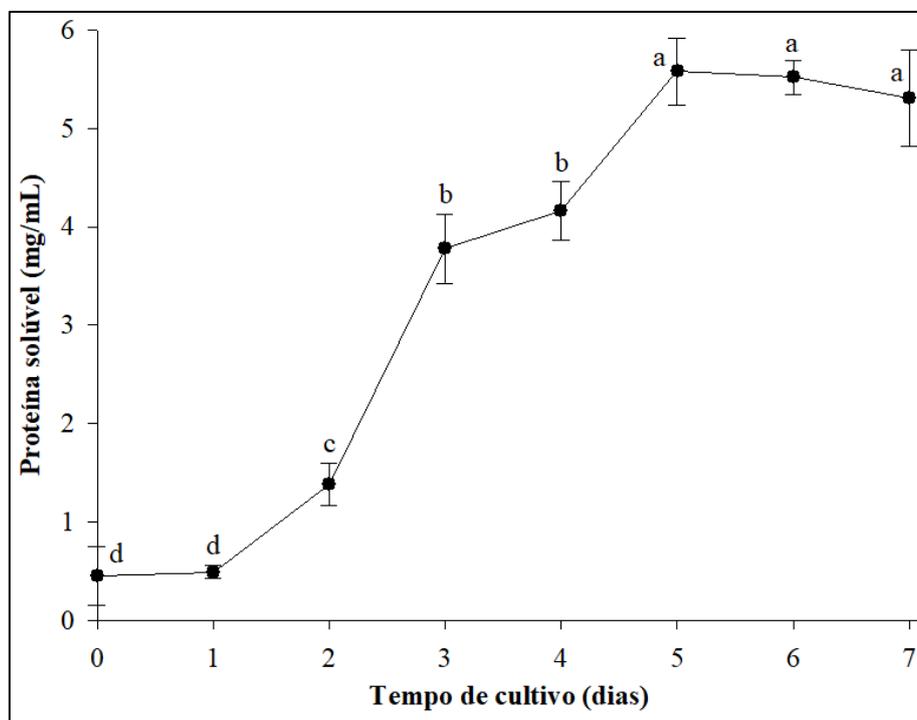


Figura 3. Concentração de proteínas solúveis durante cultivos de *Bacillus* sp. CL33A realizados em caldo farinha de penas (10 g/L de FP). Os resultados são a média \pm desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) em função do tempo de cultivo.

3.4 Bioatividades dos hidrolisados de FP (HFP)

Abordagens recentes tratam das potenciais atividades biológicas de hidrolisados proteicos derivados de resíduos ou subprodutos agroindustriais ricos em proteínas, sendo que estas bioatividades dependem dos peptídeos e aminoácidos liberados a partir da hidrólise das proteínas (LEMES et al., 2016a).

3.4.1 Atividades antioxidantes

O método ABTS é baseado na habilidade dos antioxidantes em doar elétrons para o radical ABTS. A estabilização do ABTS provoca um decréscimo na absorbância

a 734 nm das soluções deste radical, e a leitura é efetuada a partir da mistura do radical com o antioxidante. Este ensaio vem sendo realizado no estudo de antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis, compostos puros e extratos vegetais (PERÉZ et al., 2003). A capacidade dos HFP produzidos por *Bacillus* sp. CL33A em capturar o radical ABTS está apresentada na Figura 4. A captura foi aumentada de 12,8% no tempo zero, para 76,9% no 4º dia de cultivo, e estes valores permaneceram estáveis até o 7º dia.

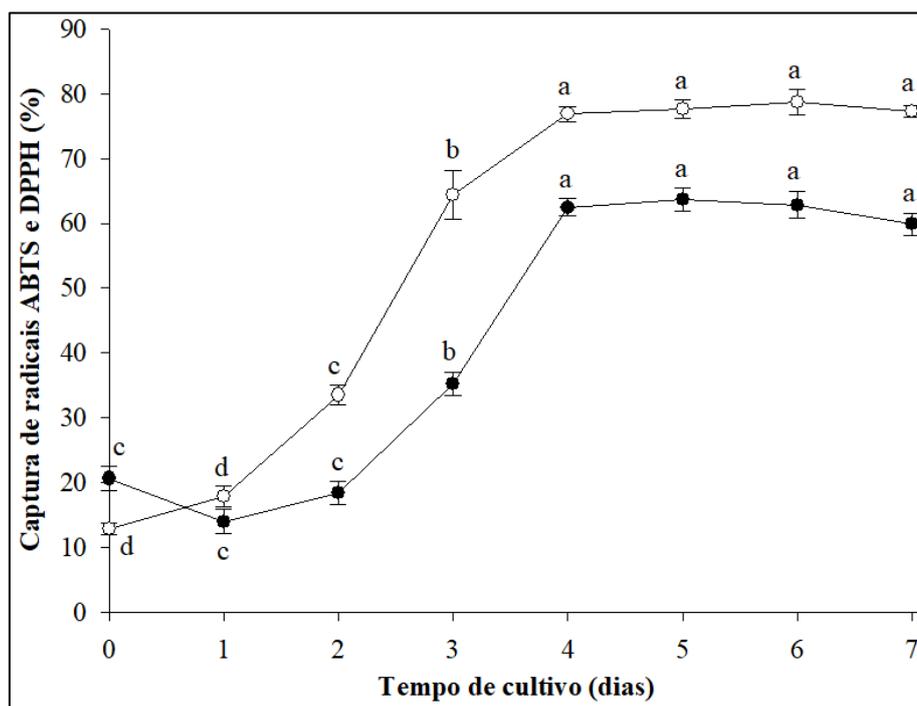


Figura 4. Captura (%) dos radicais ABTS (○) e DPPH (●) por hidrolisados de farinha de penas produzidos durante cultivos de *Bacillus* sp. CL33A em caldo farinha pena (10 g/L de FP). Os resultados são a média \pm desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) em função do tempo de cultivo, para a captura de cada radical.

O DPPH é um radical livre que aceita um elétron ou um radical de hidrogênio, tornando-se uma molécula estável. Quando isso ocorre, soluções de DPPH diminuem a cor, que é mensurada em espectrofotômetro a 517 nm. Por este motivo, é empregado como indicador para avaliar a atividade antioxidante de peptídeos e hidrolisados proteicos. No entanto, o DPPH só é solúvel em solventes orgânicos, como o metanol, e isso faz com que este ensaio seja mais eficiente para antioxidantes com propriedades hidrofóbicas (BRAND-WILLIAMS et al., 1995). Para os HFP avaliados, a partir da

capacidade antioxidante no início dos cultivos (20,6%), esta foi aumentada para 62,5% após 4 dias, permanecendo estável (59,9-63,6%) em maiores períodos de cultivo com *Bacillus* sp. CL33A (Figura 4).

Os resultados destes ensaios indicam a capacidade dos HFPs em transferir hidrogênio e elétrons para os radicais DPPH e ABTS, respectivamente e, com isso, estabilizando-os (SBROGGIO et al., 2016). A bactéria *Bacillus* sp. P45 foi usada para a bioconversão de FP, resultando em hidrolisados que apresentaram a habilidade de capturar radicais livres (LEMES et al., 2016b). A captura de radicais DPPH (68%) e ABTS (75%) também foi demonstrada para hidrolisados de pena de frango produzidos por *Chryseobacterium* sp. kr6 (FONTOURA et al., 2014). Cultivos bacterianos realizados com resíduos de vísceras de peixe, cabeças de peixe, e casca de camarão resultaram em hidrolisados proteicos com capacidade de capturar radicais (WANG et al., 2010; RAI et al., 2011; RUTHU et al., 2014).

A atividade oxidante de alguns metais, como o ferro, em inúmeras reações celulares, está estritamente ligada à produção *in vivo* de espécies reativas de oxigênio. Em situações de estresse oxidativo, o excesso de ânions superóxido (O_2^-) pode reagir com os íons Fe^{3+} que estão coligados a algumas proteínas, reduzindo-os a Fe^{2+} . Os íons Fe^{2+} , ao participarem da reação de Fenton reagindo com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), geram radicais hidroxila (OH) (JOMOVA et al., 2010), que são moléculas extremamente reativas relacionadas à causa e desenvolvimento de inúmeras doenças relacionadas ao estresse oxidativo (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Nos ensaios de capacidade quelante de Fe^{2+} , a interação entre estes íons e a ferrozina resulta na formação de complexos com coloração escura. A presença de compostos capazes de quelar Fe^{2+} reduz sua disponibilidade no meio, resultando em diminuição da formação de complexos com a ferrozina e, com isso, em redução da absorvância a 562 nm (ALAM et al., 2013). Os resultados indicam a capacidade de alguns HFP produzidos por *Bacillus* sp. CL33A em quelar Fe^{2+} (Figura 5). No 4º dia de cultivo, os HFP exibiram 28,6% de capacidade quelante, com tendência de aumento no 5º e 6º dias (31,9-34,4%), mas maior capacidade no 7º dia de cultivo (47,1%).

O ensaio de poder redutor avalia a capacidade de diferentes amostras em doar elétrons para o Fe^{3+} , reduzindo-o a Fe^{2+} . Antioxidantes reduzem complexos Fe^{3+} /ferricianeto à forma ferrosa, e o Fe^{2+} pode ser monitorado pela formação de azul da Prússia, onde uma maior Abs a 700 nm indica maior poder redutor (ALAM et al.,

2013). Para este parâmetro, observou-se aumento do poder redutor após o 2º dia de cultivo, com valores de 0,40-0,48 unidades de Abs no 4º-7º dias de cultivo (Figura 5).

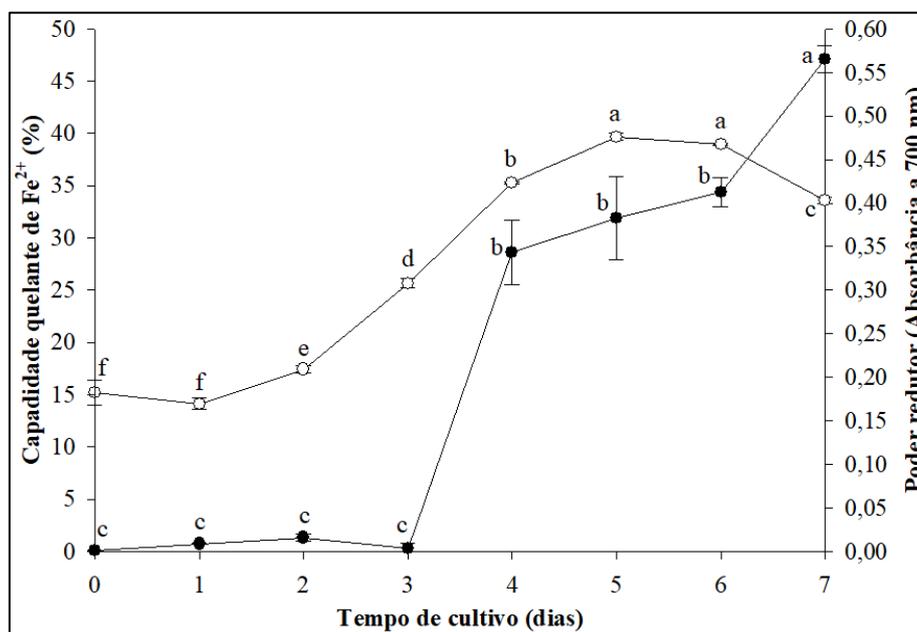


Figura 5. Capacidade quelante de Fe²⁺ (●; %) e poder redutor (○; Abs a 700 nm) de hidrolisados de farinha de penas produzidos durante cultivos de *Bacillus* sp. CL33A em caldo farinha pena (10 g/L de FP). Os resultados são a média ± desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) em função do tempo de cultivo, para cada tipo de experimento.

Hidrolisados proteicos produzidos através da biodegradação de penas por *Bacillus pumilus* A1 demonstraram habilidade de quelar Fe²⁺ (FAKHFAKH et al., 2012) e poder redutor (FAKHFAKH et al., 2011). Contudo, hidrolisados de pena produzidos por *Chryseobacterium* sp. kr6 exibiram poder redutor, mas não apresentaram a capacidade de quelar Fe²⁺ (FONTOURA et al., 2018). Além da capacidade de capturar radicais, poder redutor também foi demonstrado para hidrolisados de penas produzidos por *Bacillus* sp. MPTK6 (KUMAR et al., 2012) e *Kocuria rhizophila* p3-3 (ŁABA et al., 2018). Cultivos com diferentes bactérias em meio de cultura contendo cascas de camarão resultaram em hidrolisados proteicos que também apresentaram capacidade de quelar Fe²⁺ e reduzir Fe³⁺ (GHORBEL-BELLAAJ et al., 2012; SEDAGHAT et al., 2017).

3.4.2 Potencial antidiabético

A inibição da DPP IV pelos hidrolisados de farinha de penas produzidos por *Bacillus* sp. CL33A foi avaliada. O potencial inibidor foi de 11,9% no início dos cultivos, sendo o maior potencial de inibição da DPP IV observado após 3 dias de cultivo (57,9%); menores porcentagens de inibição (42-48%) foram observadas com maiores tempos de cultivo (Figura 6).

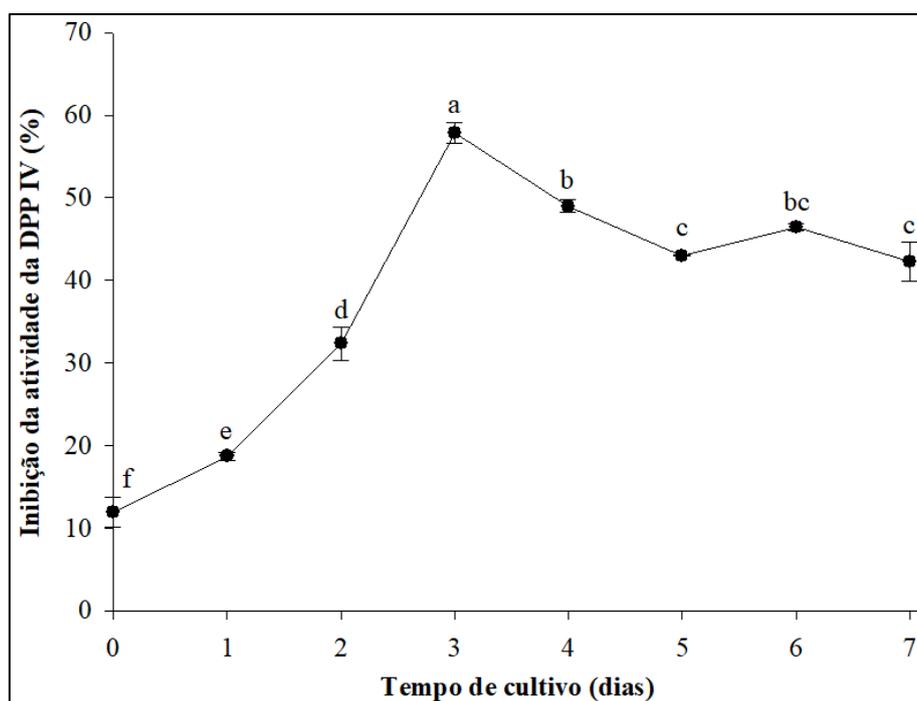


Figura 6. Inibição da DPP IV (%) por hidrolisados de farinha de penas produzidos durante cultivos de *Bacillus* sp. CL33A em caldo farinha pena (10 g/L de FP). Os resultados são a média \pm desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) em função do tempo de cultivo.

Hidrolisados proteicos, especialmente aqueles obtidos de proteínas alimentares, como as proteínas do leite, são investigados como inibidores naturais da DPP IV (POWER et al., 2014). Interesse mais recente é dedicado ao potencial de hidrolisados produzidos a partir de resíduos e subprodutos ricos em proteína (FERRARO et al., 2016). Por exemplo, a hidrólise enzimática de vísceras de sépia (um cefalópode)

(CUDENNEC et al., 2015), de proteínas da pele e de aparas de peixes (CHEUNG & LI-CHAN, 2017; HARNEDY et al., 2018) e de hemoglobina bovina (LAFARGA et al., 2016), resultaram em hidrolisados proteicos que inibiram a atividade da DPP IV.

Particularmente quanto a penas de frango, a bioconversão de penas por *Chryseobacterium* sp. kr6 originou hidrolisados proteicos capazes de inibir a DPP IV *in vitro* (FONTOURA et al., 2014). Pelo fato de a DPP IV ser uma protease, hidrolisados proteicos e peptídeos podem apresentar efeito inibitório da DPP IV através de mecanismo competitivo, ou seja, os peptídeos competem com os substratos (GLP-1 e GIP) pelo sítio ativo da DPP IV (POWER et al., 2014).

4 CONCLUSÕES

A bactéria queratinolítica *Bacillus* sp CL33A pode ser considerada hábil para a solubilização de FP e produção de proteases. Proteases bacterianas podem apresentar significância para processos enzimáticos em nível comercial/industrial.

Ensaio revelaram o potencial antioxidante dos HFPs, resultante da capacidade dos hidrolisados em transferir átomos de hidrogênio e elétrons para moléculas oxidantes, bem como da capacidade de quelar íons ferrosos. Estas propriedades podem ser relevantes considerando os efeitos nocivos de radicais livres e íons metálicos pró-oxidantes em sistemas biológicos e alimentos.

Os HFPs apresentaram, *in vitro*, a capacidade de inibir a enzima DPP IV, indicando a possibilidade de obter peptídeos antidiabéticos a partir da hidrólise microbiana da FP, um material abundante e de baixo custo.

Nas condições utilizadas, cultivos realizados por 4 dias com *Bacillus* sp. CL33A em caldo farinha de penas foram os mais apropriados para a obtenção de proteases e hidrolisados bioativos.

Considerando o uso limitado da FP em nutrição animal, a bioconversão microbiana pode ser benéfica para a obtenção de produtos com valor agregado, abrindo espaço para investigações relacionadas à caracterização e potencial aplicações das proteases e hidrolisados bioativos.

REFERÊNCIAS

ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, p. 143-152, 2013.

ANBU, P., GOPINATH SCB, HILDA, A., MATHIVANAN N., ANNADURAI G. Secretaion of Keratinolitic enzymes and Keratinolysis by *Scopulariospsis brevicaulis* and *Trichophyton mentagrophytes*: regression analysis. **Canadian Journal of Microbiology** 52:1060-9, 2006.

BACH, E.; DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; BRANDELLI, A. Production and properties of keratinolytic proteases from three novel Gram-negative feather-degrading bacteria isolated from Brazilian soils. **Biodegradation**, v. 22, p. 1191-1201, 2011

BOSE, A.; PATHAN, A.; PATHAK, K., KEHARIA, H. Keratinolytic protease production by *Bacillus amyloliquefaciens* 6B using feather meal as substrate and application of feather hydrolysate as organic nitrogen input for agricultural soil. **Waste and Biomass Valorization**, v. 5, p. 595-605, 2014.

BRANDELLI, A. Bacterial keratinases: useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond. **Food and Bioprocess Technology** 1, 105-116, 2008.

CHEUNG, I. W. Y.; LI-CHAN, E. C. Y. Enzymatic production of protein hydrolysates from steelhead (*Oncorhynchus mykiss*) skin gelatin as inhibitors of dipeptidyl-peptidase IV and angiotensin-I converting enzyme. **Journal of Functional Foods**, v. 28, p. 254-264, 2017.

CONTESINI, F. J.; MELO, R. R.; SATO, H. H. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, p. 321-334, 2018.

CORRÊA, A. P. F.; DAROIT, D. J.; BRANDELLI, A. Characterization of a keratinase produced by *Bacillus* sp. P7 isolated from an Amazonian environment. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, p. 1-6, 2010.

CUDENNEC, B.; BALTI, R.; RAVALLEC, R.; CARON, J.; BOUGATEF, A.; DHULSTER, P.; NEDJAR, N. *In vitro* evidence for gut hormone stimulation release and dipeptidyl-peptidase IV inhibitory activity of protein hydrolysate obtained from cuttlefish (*Sepia officinalis*) viscera. **Food Research International**, v. 78, p. 238-245, 2015.

DAROIT, D. J.; BRANDELLI, A. A current assessment on the production of bacterial keratinases. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 34, p. 372-384, 2014.

EMBRAPA, EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Estatística. Mundo. Frangos de corte. Central de Inteligência de Aves e Suínos. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2018. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas/frangos/mundo>>. Acesso em Novembro de 2018.

FAKHFAKH, N.; KTARI, N.; HADDAR, A.; MNIF, I. H.; DAHMEN, I.; NASRI, M. Total solubilisation of the chicken feathers by fermentation with a keratinolytic bacterium, *Bacillus pumilus* A1, and the production of protein hydrolysate with high antioxidative activity. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1731-1737, 2011.

FAKHFAKH, N.; GARGOURI, M.; DAHMEN, I.; SELLAMI-KAMOUN, A.; EL FEKI, A.; NASRI, M. Improvement of antioxidant potential in rats consuming feathers protein hydrolysate obtained by fermentation of the keratinolytic bacterium, *Bacillus pumilus* A1. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 938-949, 2012.

FERRAREZE, P. A. G.; CORRÊA, A. P. F.; BRANDELLI, A. Purification and characterization of a keratinolytic protease produced by probiotic *Bacillus subtilis*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 102-109, 2016.

FERRARI, K.C.; SILVA, M. W. Metabolismo mitocondrial, radicais livres e envelhecimento. *Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia*, v. 14, p. 443-445, 2008.

FERRARO, V.; ANTON, M.; SANTÉ-LHOUELLIER, V. The “sisters” α -helices of collagen, elastin and keratin recovered from animal by-products: functionality, bioactivity and trends of application. **Trends in Food Science and Technology**, v. 51, p. 65-75, 2016.

FONTOURA, R.; DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; MEIRA, S. M. M.; MOSQUERA, M.; BRANDELLI, A. Production of feather hydrolysates with antioxidant, angiotensin-I converting enzyme- and dipeptidyl peptidase-IV-inhibitory activities. **New Biotechnology**, v. 31, p. 506-513, 2014.

FONTOURA, R.; DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; MORESCO, K. S.; SANTI, L.; BEYS-DA-SILVA, W. O.; YATES III, J. R.; MOREIRA, J. C. F.; BRANDELLI, A. Characterization of a novel antioxidant peptide from feather keratin hydrolysates. **New Biotechnology**, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2018.09.003>

GIOVANNI, S.J.; RAPPÉ, M., Evolution, diversity and molecular ecology of marine prokaryotes. In: Kirchman, D.L. (Ed.) **Microbial Ecology of the Oceans**. Wiley-Liss, 47-84, 2000.

GHASEMI, Y.; SHAHBAZI, M.; RASOUL-AMINI, S.; KARGAR, M.; SAFARI, A.; KAZEMI, A.; MONTAZERI-NAJAFABADY, N. Identification and characterization of feather-degrading bacteria from keratin-rich wastes. **Annals of Microbiology**, v. 62, p.

GUPTA R, RAMNANI P (2012) Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, p. 21-33, 2012.

GHORBEL-BELLAJ, O.; JRIDI, M.; BEN KHALED, H.; JELLOULI, K.; NASRI, M. Bioconversion of shrimp shell waste for the production of antioxidant and chitosan used as fruit juice clarifier. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, p. 1835-1841, 2012.

HARNEDY, P. A.; PARTHSARATHY, V.; MCLAUGHLIN, C. M.; O'KEEFFE, M. B.; ALLSOPP, P. J.; MCSORLEY, E. M.; O'HARTE, F. P. M.; FITZGERALD, R. J. Blue whiting (*Micromesistius poutassou*) muscle protein hydrolysate with *in vitro* and *in vivo* antidiabetic properties. **Journal of Functional Foods**, v. 40, p. 137-145, 2018.

ICHIDA, J. M.; KRIZOVA, L.; LEFEVRE, C. A.; KEENER, H. M.; ELWELL, D. L.; BURTT JR., E. H. Bacterial inoculum enhances keratin degradation and biofilm formation in poultry compost. **Journal of Microbiological Methods**, v. 47, p. 199-208, 2001.

KAHN, S. E.; COOPER, M. E.; DEL PRATO, D. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. **Lancet**, v. 383, p. 1068-1083, 2014.

KIST, L. T., et al Cleaner production in the management of waste use at a poultry slaughterhouse of vale do Taquari, Brazil: a case study. **Journal of Cleaner Production** 17, 1200-1205, 2009.

KOJIMA, K.; HAMA, T.; KATO, T.; NAGATSU, T. Rapid chromatographic purification of dipeptidyl peptidase IV in human submaxillary gland. **Journal of Chromatography**, v. 189, p. 233-240, 1980.

KOTA, K.P.; SHAIK, S.S.; KOTA, R.K.; KARLAPUDI, A.P. Bioplastic from chicken feather waste. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 27, p. 373-375, 2014.

KUMAR, D. J. M.; PRIYA, P.; BALASUNDARI, S. N.; DEVI, G. N.; REBECCA, A. I. N.; KALAICHELVAN, P. T. Production and optimization of feather protein hydrolysate from *Bacillus* sp. MPTK6 and its antioxidant potential. **Middle-East Journal of Scientific Research**, v. 11, p. 900-907, 2012.

ŁABA, W.; ŻAROWSKA, B.; CHORAŻYK, D.; PUDŁO, A.; PIEGZA, M.; KANCELISTA, A.; KOPEĆ, W. New keratinolytic bacteria in valorization of chicken feather waste. **AMB Express**, v. 8, artigo 9, 2018.

LAFARGA, T.; RAI, D. K.; O'CONNOR, P.; HAYES, M. Generation of bioactive hydrolysates and peptides from bovine hemoglobin with *in vitro* renin, angiotensin-I-

converting enzyme and dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activities. **Journal of Food Biochemistry**, v. 40, p. 673-685, 2016.

LASEKAN, A.; BAKAR, F. A.; HASHIM, D. Potential of chicken by-products as sources of useful biological resources. **Waste Management**, v. 33, p. 552-565, 2013.

LEMES, A. C.; SALA, L.; ORES, J. C.; BRAGA, A. R. C.; EGEEA, M. B.; FERNANDES, K. F. A review of the latest advances in encrypted bioactive peptides from protein-rich waste. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, artigo 950, 2016a.

LEMES, A. C.; ÁLVARES, G. T.; EGEEA, M. B.; BRANDELLI, A.; KALIL, S. J. Simultaneous production of proteases and antioxidant compounds from agro-industrial by-products. **Bioresource Technology**, v. 222, p. 210-216, 2016b.

MACIEL, J. L.; WERLANG, P. O.; DAROIT, D. J.; BRANDELLI, A. Characterization of protein-rich hydrolysates produced through microbial conversion of waste feathers. **Waste and Biomass Valorization**, v. 8, p. 1177-1186, 2017.

MADIGAN, M.; MARTINKO, J.; BENDER, K.; BUCKLEY, D.; STAHL, D. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MAZOTTO, A. M.; COELHO, R. R. R.; CEDROLA, S. M. L.; LIMA, M. F.; COURI, S.; SOUZA, E. P.; VERMELHO, A. B. Keratinase production by three *Bacillus* spp. using feather meal and whole feather as substrate in a submerged fermentation. **Enzyme Research**, v. 2011, artigo 523780, 2011.

NUNES, R. V. **Digestibilidade de nutrientes e valores energéticos de alguns alimentos para aves**. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa, 2003. 103 f. Dissertação (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

ONIFADE, A. A., et al. A review: potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. **Bioresource Technology** 66,1-11, 1998.

PEREIRA, JR, Nei; BON, E. P. Silva; FERRARA;. **SÉRIES EM BIOTECNOLOGIA: Tecnologia de Bioprocessos**. Rio de Janeiro: Biblioteca Nacional, 2008.

POWER, O.; NONGONIERMA, A. B.; JAKEMAN, P.; FITZGERALD, R. J. Food protein hydrolysates as a source of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides for the management of type 2 diabetes. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 73, p. 34-46, 2014.

PICCHI, V. **Graxaria – Estrutura e Operacionalização**. In: Abate e Processamento de Frangos, Ed. FACTA. p. 111-114. 1994

POOLE, A. J., et al. Environmentally sustainable fibers from regenerated protein. **Biomacromolecules** 10, 1-8,2009.

QUEIROGA, C.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Potential use of wool-associated *Bacillus* species for biodegradation of keratinous materials. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 70, p. 60-65, 2012.

RAI, A. K.; JINI, R.; SWAPNA, H. C.; SACHINDRA, N. M.; BHASKAR, N.; BASKARAN, V. Application of native lactic acid bacteria (LAB) for fermentative recovery of lipids and proteins from fish processing wastes: bioactivities of fermentation products. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 20, p. 32-44, 2011.

RIFFEL, A.; BRANDELLI, A. Keratinolytic bacteria isolated from feather waste. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 395-399, 2006.

RUTHU, N.; MURTHY, P. S.; RAI, A. K.; BHASKAR, N. Fermentative recovery of lipids and proteins from freshwater fish head waste with reference to antimicrobial and antioxidant properties of protein hydrolysate. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, p. 1884-1892, 2014.

SBROGGIO, M. F.; MONTILHA, M. S.; FIGUEIREDO, V. R. G.; GEORGETTI, S. R.; KUROZAWA, L. E. Influence of the degree of hydrolysis and type of enzyme on antioxidant activity of okara protein hydrolysates. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 36, p. 375-381, 2016.

SEDAGHAT, F.; YOUSEFZADI, M.; TOISERKANI, H.; NAJAFIPOUR, S. Bioconversion of shrimp waste *Penaeus merguensis* using lactic acid fermentation: an alternative procedure for chemical extraction of chitin and chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 883-888, 2017.

SEKAR, V.; KANNAN, M.; GANESAN, R.; DHEEBA, B.; SIVAKUMAR, N.; KANNAN, K. 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, p. 567-575, 2016.

SINKIEWICZ, I.; STAROSZCZYK, H.; ŚLIWIŃSKA, A. Solubilization of keratins and functional properties of their isolates and hydrolysates. **Journal of Food Biochemistry**, v. 42, e12494, 2018.

SON, H. J.; PARK, H. C.; KIM, H. S.; LEE, C. Y. Nutritional regulation of keratinolytic activity in *Bacillus pumilis*. **Biotechnology Letters**, v. 30, p. 461-465, 2008.

VERMA, A.; SINGH, H.; ANWAR, S.; CHATTOPADHYAY, A.; TIWARI, K. K.; KAUR, S.; DHILON, G. S. Microbial keratinases: industrial enzymes with waste management potential. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, p. 476-491, 2017.

VILLA, A. L. V. **Produção e aplicação de peptídeos de hidrolisado de penas de frango na cosmética capilar**. 2008. 121 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

WANG, S.-L.; CHANG, T.-J.; LIANG, T.-W. Conversion and degradation of shellfish wastes by *Serratia* sp. TKU016 fermentation for the production of enzymes and bioactive materials. **Biodegradation**, v. 21, p. 321-333, 2010.