UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS CERRO LARGO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AMBIENTE E TECNOLOGIAS SUSTENTÁVEIS

RUBIA GODOY HOFFMANN

USO DE UMA PROTEASE BACTERIANA NA OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS ANTIOXIDANTES A PARTIR DE SUBPRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL

CERRO LARGO
2023

RUBIA GODOY HOFFMANN

USO DE UMA PROTEASE BACTERIANA NA OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS ANTIOXIDANTES A PARTIR DE SUBPRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL

Dissertação apresentada para o Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de Mestre em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Joner Daroit

CERRO LARGO

2023

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Hoffmann, Rubia Godoy
USO DE UMA PROTEASE BACTERIANA NA OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS ANTIOXIDANTES A PARTIR DE SUBPRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL / Rubia Godoy Hoffmann. -- 2023.
70 f.

Orientador: Dr. Daniel Joner Daroit

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis, Cerro Largo,RS, 2023.

1. Enzima. 2. Biocatálise. 3. Hidrolisado proteico. 4. Potencial bioativo. I. Daroit, Daniel Joner, orient. II. Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

RUBIA GODOY HOFFMANN

USO DE UMA PROTEASE BACTERIANA NA OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS ANTIOXIDANTES A PARTIR DE SUBPRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL

Dissertação apresentada para o Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de Mestre em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis.

Este trabalho de conclusão foi deferido e aprovado pela banca em: 26/09/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Daniel Joner Daroit
Orientador

Prof[a]. Dr. Lisiane Martins Volcão
Avaliadora

Prof[a]. Dr. Lauren Lúcia Zamin
Avaliadora

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal da Fronteira Sul pelo acesso ao ensino gratuito e de qualidade, bem como ao Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis pela disponibilidade, auxílio e oportunidades de aprendizagem.

Agradeço em especial ao meu orientador, Prof. Dr. Daniel Joner Daroit, pela paciência, dedicação e todo auxílio para que a pesquisa pudesse ser desenvolvida.

Agradeço às amigas e colegas de laboratório, Carolina e Gabriela, que foram também voluntárias na pesquisa, que muito me auxiliaram e me ensinaram.

Agradeço ao meu companheiro Tiago pela compreensão e apoio neste período de abdicação de tempo pelo estudo e pesquisa.

Agradeço aos meus familiares, Alfredo, Elizete, Kati e Carlos pelo incentivo e palavras de apoio.

Agradeço aos meus sócios da Ambiental SS Engenharia e Consultoria, Douglas e Lidiane, pela compreensão, incentivo e paciência.

Muito obrigada!

RESUMO

A hidrólise enzimática de proteínas recebe contínua atenção devido à possibilidade de liberação de peptídeos bioativos com potencial relevância à saúde humana e à tecnologia de alimentos. A capacidade antioxidante está entre as bioatividades descritas para hidrolisados proteicos. Crescente interesse reside tanto no uso de subprodutos e resíduos agroindustriais como substratos para a obtenção de hidrolisados antioxidantes, quanto na aplicação de proteases microbianas não-comerciais nos processos hidrolíticos. Este trabalho buscou avaliar a capacidade da protease bruta de *Bacillus* sp. CL18 como biocatalisador para a produção de hidrolisados proteicos antioxidantes a partir de subprodutos oriundos do setor alimentar, mais especificamente do processamento de carnes. A protease bacteriana foi capaz de hidrolisar os 12 subprodutos investigados (derivados de suínos, bovinos, frangos e peixes), como detectado pelo incremento no conteúdo de proteínas solúveis após 4 h de atuação da protease bruta. Os hidrolisados (4 h) exibiram capacidade antioxidante superior aos subprodutos não hidrolisados, demonstrada por meio da eliminação de radicais livres, quelação de Fe^{2+} e redução de Fe^{3+}. Dentre os substratos analisados, o pulmão bovino foi selecionado para avaliação do efeito do tempo de hidrólise (0-8 h) e da relação enzima/substrato (E/S; 384, 860 e 1.400 U/g) sobre o potencial antioxidante dos hidrolisados. A maior relação E/S acelerou o incremento das atividades antioxidantes, embora não tenha resultado em potenciais bioativos superiores àqueles detectados com o uso da relação E/S intermediária. Indica-se para a obtenção de atividades antioxidantes ótimas, as hidrólises possam ser realizadas por 6 h, aplicando uma relação E/S de 860 U/g. Os hidrolisados apresentaram teor de proteínas solúveis (3,13 mg/mL), capacidade de eliminar radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (10,2%) e 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) (68,1%), quelação de Fe^{2+} (70,8%) e poder redutor [0,119 unidades de absorbância a 700 nm (Abs700)], que foram 3,6, 2,2, 4,3, 1,5 e 6,6 vezes maiores, respectivamente, do que o substrato não hidrolisado. Em conclusão, indica-se que os subprodutos avaliados são fontes potenciais de peptídeos bioativos, que podem ser liberados por processos enzimáticos, bem como a capacidade da protease de *Bacillus* sp. CL18 para esta finalidade. Tal estratégia apresenta-se promissora para a valorização de subprodutos de origem animal gerados em grande quantidade por atividades agroindustriais.

Palavras-chave: Enzima. Biocatálise. Hidrolisado proteico. Potencial bioativo.

ABSTRACT

Enzymatic hydrolysis of proteins receives continuous attention due to the possibility of releasing bioactive peptides with potential relevance to human health and food technology. Antioxidant capacity is among the bioactivities described for protein hydrolysates. Growing interest resides both in the use of agro-industrial by-products and wastes as substrates for obtaining antioxidant hydrolysates, and in the application of non-commercial microbial proteases in hydrolytic processes. This work aimed to evaluate the capacity of a crude protease from *Bacillus* sp. CL18 as a biocatalyst for the production of antioxidant protein hydrolysates from by-products of the food sector, more specifically meat processing. The bacterial protease was capable of hydrolyzing the 12 investigated by-products (from porcine, bovine, chicken and fish sources), as detected by the increase in soluble protein content after 4 h of crude protease activity. Hydrolysates (4 h) exhibited higher antioxidant capacity than non-hydrolyzed by-products, as demonstrated by free radical scavenging, Fe^{2+} chelation, and Fe^{3+} reduction abilities. Among the substrates analyzed, bovine lung was selected to evaluate the effect of hydrolysis time (0-8 h) and enzyme/substrate ratio (E/S; 384, 860 and 1,400 U/g) on the antioxidant potential of the hydrolysates. The higher E/S ratio accelerated the increase of antioxidant activities, although it did not result in bioactive potentials higher than those detected using the intermediate E/S ratio. It is indicated to obtain optimal antioxidant activities, the hydrolysis could be carried out for 6 h, applying an E/S ratio of 860 U/g. Hydrolysates showed soluble protein content (3.13 mg/mL), the ability to eliminate 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (10.2%) and 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) (68.1%), Fe^{2+} chelation (70.8%) and reducing power [0.119 absorbance units at 700 nm (Abs700)], which were 3.6, 2.2, 4.3, 1.5 and 6.6 fold higher, respectively, than unhydrolyzed substrate. In summary, it is indicated that the evaluated by-products are potential sources of bioactive peptides, that can be released through enzymatic processes, as well as the ability of the *Bacillus* sp. CL18 protease for this purpose. This strategy is promising for the valorization of animal by-products generated in large amounts by agro-industrial activities.

Keywords: Enzyme. Biocatalysis. Protein hydrolysate. Bioactive potential.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Produção de protease por *Bacillus* sp. CL18..... 32

Figura 2 – Incremento da concentração de proteínas solúveis pela ação da protease bruta de *Bacillus* sp. CL18 sobre subprodutos de origem animal em relação aos seus respectivos controles. Todos os hidrolisados (enzima) apresentaram concentrações superiores em relação aos respectivos controles ($p < 0,05$)..... 33

Figura 3 – Captura do radical DPPH por hidrolisados de subprodutos de origem animal e seus respectivos controles. Todos os hidrolisados (enzima) apresentaram capturas superiores do radical em relação aos respectivos controles ($p < 0,05$)..... 35

Figura 4 – Captura do radical ABTS por hidrolisados de subprodutos de origem animal e seus respectivos controles. Todos os hidrolisados (enzima) apresentaram capturas superiores do radical em relação aos respectivos controles ($p < 0,05$)..... 36

Figura 5 – Capacidade de quelação de Fe^{2+} por hidrolisados de subprodutos de origem animal e seus respectivos controles. Todos os hidrolisados (enzima) apresentaram quelações superiores em relação aos respectivos controles ($p < 0,05$)..... 37

Figura 6 – Poder redutor mensurado em hidrolisados de subprodutos de origem animal e seus respectivos controles. Todos os hidrolisados (enzima) apresentaram poder redutor superior em relação aos respectivos controles ($p < 0,05$)..... 38

Figura 7 – Concentração de proteínas solúveis em função do tempo de hidrólise de pulmão bovino usando diferentes relações E/S (■, 384 U/g; ●, 860 U/g; ○, 1.400 U/g)..... 44

Figura 8 – Captura do radical DPPH por hidrolisados de pulmão bovino em função do tempo de hidrólise usando diferentes relações E/S (■, 384 U/g; ●, 860 U/g; ○, 1.400 U/g)..... 46

Figura 9 – Captura do radical ABTS por hidrolisados de pulmão bovino em função do tempo de hidrólise usando diferentes relações E/S (■, 384 U/g; ●, 860 U/g; ○, 1.400 U/g)..... 47

Figura 10 – Capacidade de quelação de Fe^{2+} por hidrolisados de pulmão bovino em função do tempo de hidrólise usando diferentes relações E/S (■, 384 U/g; ●, 860 U/g; ○, 1.400 U/g)..... 48

Figura 11 – Poder redutor de hidrolisados de pulmão bovino obtidos em função do tempo de hidrólise usando diferentes relações E/S (■, 384 U/g; ●, 860 U/g; ○, 1.400 U/g)..... 49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Hidrolisados proteicos antioxidantes produzidos a partir de subprodutos de origem animal usando proteases microbianas comerciais.....25
Tabela 2. Hidrolisados antioxidantes obtidos a partir de subprodutos de origem animal usando proteases microbianas não-comerciais.....26

LISTA DE ABREVIATURAS

E/S	Enzima/Substrato
SmF	Fermentações submersas
SSF	Fermentações em estado sólido
pH	Potencial hidrogeniônico
ABTS	Radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-ácido sulfônico
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
PCA	Ágar Padrão para Contagem
Abs	Absorbância
U	Uma unidade de atividade proteolítica definida como a quantidade de enzima a aumentar em 0,1 unidade a absorbância a 420 nm
I	Farinha de ossos
II	Penas de frango
III	Escamas de tilápia
IV	Resíduos do corte de carnes e ossos bovinos em serra-fita
V	Fígado bovino
VI	Fígado de frango
VII	VII pulmões bovinos
VIII	Pulmões suínos
IX	Rins bovinos
X	Rins suínos
XI	Vísceras de tilápia

XII Espinhaço de salmão com carne residual aderida do processo de filetagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 14

1.1 OBJETIVOS..... 15

1.1.1 Objetivo geral.....15

1.1.2 Objetivos específicos.....15

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....16

2.1 PROTEASES MICROBIANAS..... 16

2.1.1 Aplicações de proteases microbianas..... 17

2.2 HIDROLISADOS PROTEICOS E POTENCIAL ANTIOXIDANTE.....19

2.2.1 Produção de hidrolisados proteicos antioxidantes.....21

2.3 UTILIZAÇÃO DE SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA DA CARNE E PESCADO..23

2.3.1 Obtenção de hidrolisados proteicos antioxidantes a partir de subprodutos de origem animal..... 25

3 MATERIAL E MÉTODOS.....29

3.1 PRODUÇÃO DE PROTEASE..... 29

3.1.1 Detecção da atividade proteolítica..... 29

3.2 SUBPRODUTOS DO SETOR DE PRODUÇÃO DE CARNES..... 30

3.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DOS SUBPRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL.....30

3.4 CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS NOS HIDROLISADOS..... 31

3.5 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTES DOS HIDROLISADOS..... 31

3.5.1 Captura do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)..... 31

3.5.2 Captura do radical 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS)..... 32

3.5.3 Atividade quelante de Fe^{2+}.....32

3.5.4 Poder redutor.....33

3.6 SELEÇÃO DE SUBSTRATO E EFEITOS DE VARIÁVEIS SOBRE O POTENCIAL ANTIOXIDANTE..... 33

3.7 ANÁLISE DOS DADOS.....33

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 34

4.1 PRODUÇÃO DE PROTEASE POR Bacillus SP. CL18..... 34
4.2 HIDRÓLISE DE SUBPRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL..... 34
4.3 POTENCIAL ANTIOXIDANTE DOS HIDROLISADOS.....36
4.4 POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE HIDROLISADOS DE PULMÃO BOVINO: EFEITO DO TEMPO DE HIDRÓLISE E DA RELAÇÃO ENZIMA/SUBSTRATO (E/S)..... 46
5 CONCLUSÃO..... 53
REFERÊNCIAS..... 54

1 INTRODUÇÃO

Enzimas são fundamentais à manutenção do metabolismo, constituindo o alicerce para a existência da vida. Por sua ação catalítica específica e eficiente na conversão de substratos em produtos, enzimas encontram aplicação em diversos processos tecnológicos. De fato, a biocatálise caracteriza-se como uma ferramenta relevante à produção industrial. Estes biocatalisadores vêm substituindo, completa ou parcialmente, a utilização de produtos químicos perigosos, contribuindo para uma produção mais sustentável, além de possibilitar a proposição de processos inovadores (SINGH; BAJAJ, 2017; GIMENES *et al*., 2021).

Naveed *et al*. (2021) afirma que a maior parte das enzimas aplicadas industrialmente são hidrolases e, neste sentido, as proteases são predominantes. Enzimas proteolíticas vêm sendo empregadas em processos e produtos onde a hidrólise de ligações peptídicas é necessária, e os principais consumidores destas enzimas são indústrias de detergentes, couros e alimentos.

Corrobora-se com Sharma *et al*. (2019), quando infere que proteases produzidas por microrganismos são majoritariamente utilizadas, considerando o melhor custo-benefício e a produção de um suprimento contínuo de enzimas, quando comparadas às proteases de origem animal e vegetal.

A produção de hidrolisados proteicos antioxidantes vem despertando interesse como uma das aplicações das proteases microbianas, considerando os potenciais benefícios destes hidrolisados para a saúde humana e sua aplicabilidade na indústria alimentícia. Os principais substratos proteicos investigados como fontes de peptídeos antioxidantes são proteínas alimentares, como aquelas da soja e do leite (DAROIT; BRANDELLI, 2021).

Contudo, subprodutos residuais ricos em proteína, gerados em abundância pelas indústrias da carne e pescado, têm se apresentado como substratos promissores para a obtenção de hidrolisados antioxidantes por meio de enzimas microbianas (PHADKE *et al*., 2021; SHIRSATH; HENCHION, 2021).

Proteases microbianas comerciais são os biocatalisadores mais usualmente explorados para a obtenção de hidrolisados bioativos a partir de diversas proteínas e substratos proteicos (TOLDRÁ *et al*., 2020). No entanto, investigações mais recentes descrevem a utilização de enzimas proteolíticas alternativas, produzidas por linhagens bacterianas e fúngicas isoladas de diferentes ambientes, o que pode

contribuir para a expansão do arsenal de enzimas apropriadas à geração de hidrolisados proteicos antioxidantes (BRANDELLI; DAROIT, *no prelo*), atrelado ainda a vantagem da valorização econômica de subprodutos residuais altamente poluentes se não tratados ou destinados de forma adequada.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a protease bruta de *Bacillus* sp. CL18 quanto à produção de hidrolisados proteicos antioxidantes a partir de diferentes subprodutos de origem animal.

1.1.2 Objetivos específicos

- Produzir a protease bruta de *Bacillus* sp. CL18 em cultivos submersos;
- Aplicar a protease na hidrólise de subprodutos do setor de carnes;
- Avaliar, in vitro, a capacidade dos hidrolisados em eliminar radicais, quelar Fe^{2+} e reduzir Fe^{3+};
- Investigar o potencial antioxidante de hidrolisados do subproduto mais promissor em função do tempo de hidrólise e diferentes relações enzima/substrato (E/S).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PROTEASES MICROBIANAS

Proteases são enzimas produzidas por todas as formas de vida, e suas funções estão relacionadas à capacidade de hidrolisar ligações peptídicas em proteínas e peptídeos, liberando como produtos peptídeos de menor tamanho e mesmo aminoácidos livres. Ademais, estas enzimas apresentam-se como importantes elementos tecnológicos empregados em vários setores produtivos, tanto como partes integrantes de processos quanto como ingredientes presentes em produtos comerciais. Como indicador de sua relevância industrial, estima-se que as enzimas proteolíticas respondam por cerca de 2/3 das enzimas comercializadas no cenário global (GIMENES; SILVEIRA; TAMBOURGI, 2021).

O uso de proteases produzidas por microrganismos é prevalente em relação àquelas obtidas a partir de animais e plantas. Isso se deve ao fato de os microrganismos produzirem maiores quantidades de enzimas em menor tempo e utilizando menores espaços. Além disso, não há dependência de fatores climáticos e sua obtenção não é perpassada, via de regra, por discussões de natureza ética (CONTESINI; MELO; SATO, 2018). Neste panorama, uma fatia de aproximadamente 40% do mercado mundial de enzimas corresponde somente à comercialização de proteases obtidas a partir de microrganismos (NAVEED *et al*., 2021).

Bactérias e fungos são encontrados em virtualmente todos os ambientes e, nestes locais, produzem proteases extracelulares como estratégia para angariar nutrientes. Estas enzimas atuam sobre substratos proteicos macromoleculares, de modo que os aminoácidos e peptídeos liberados pela hidrólise possam ser absorvidos e utilizados na manutenção e reprodução dos microrganismos (VRANOVA; REJSEK; FORMANEK, 2013).

Ainda, enfatiza-se que a elevada diversidade microbiana merece destaque no contexto biotecnológico, visto que essa biodiversidade pode ser traduzida em enzimas com propriedades distintas (AGUILAR; SATO, 2018). Deste modo, inúmeros microrganismos proteolíticos vêm sendo isolados a partir de diferentes locais e condições ambientais, e então avaliados como fontes de proteases apropriadas para diferentes usos (GIMENES; SILVEIRA; TAMBOURGI, 2021).

Bactérias do gênero *Bacillus* figuram como as principais fontes de enzimas proteolíticas. Além da enorme biodiversidade, representantes deste gênero usualmente exibem rápidas taxas de crescimento e a habilidade de secretar elevadas quantidades de proteínas, incluindo enzimas, para o meio extracelular. Estas propriedades são relevantes no que se refere ao rendimento e à produtividade de proteases, e também adquirem importância devido à maior simplicidade dos processos de recuperação dos biocatalisadores após os cultivos bacterianos (CONTESINI; MELO; SATO, 2018; VAN DIJL; HECKER, 2013).

A produção de proteases bacterianas para fins tecnológicos ocorre, majoritariamente, através de processos denominados de fermentações submersas (SmF), permitindo melhor monitoramento e maior facilidade de manejo em relação às fermentações em estado sólido (SSF). Nas SmF, o crescimento microbiano ocorre em um meio líquido, caracterizado pelo excesso de água livre, que contém os substratos fornecidos aos microrganismos para sustentar seu crescimento e a consequente produção das enzimas de interesse (ARYA *et al*., 2021).

Embora substratos solúveis sejam comumente investigados na produção de proteases microbianas, há a possibilidade de utilizar meios de cultura alternativos para a produção destas enzimas. Resíduos de origem animal e vegetal, oriundos do setor de produção de carnes, por exemplo, vêm sendo prospectados como substratos amplamente disponíveis e de baixo valor, ou até mesmo tratados como rejeitos que demandam custos para disposição final adequada dentro da legislação vigente do país, potencialmente colaborando para a redução dos custos de obtenção de enzimas microbianas (SHARMA *et al*., 2022).

2.1.1 Aplicações de proteases microbianas

O rol de aplicações das proteases produzidas por microrganismos é extenso. Pode-se destacar, inclusive como um dos primeiros usos tecnológicos, sua adição como ingredientes em detergentes, particularmente aqueles usados na lavagem de roupas. Neste caso, busca-se por proteases compatíveis com os ingredientes químicos e com o pH usualmente alcalino (pH 8,0-10,0) dos detergentes, de modo que a atividade hidrolítica das enzimas seja mantida nas condições de lavagem, auxiliando na remoção de sujidades proteicas (NAVEED *et al*., 2021).

Proteases microbianas ativas em pHs neutros e/ou alcalinos (pH 7,0-12,0), vêm sendo aplicadas na indústria do couro, por exemplo, na remoção de pelos a partir das peles. A depilação enzimática, além de ser mais eficiente, e resultar na mesma (ou maior) qualidade dos couros, também ocasiona reduções no volume e na carga poluente dos efluentes gerados, quando comparada à elevada demanda bioquímica de oxigênio e à toxicidade dos insumos químicos tradicionalmente utilizados na depilação (HASAN; HAQUE; RAHMAN, 2022).

Corrobora-se com Matkawala *et al.* (2021), ao afirmar que as enzimas proteolíticas estão sendo utilizadas de forma recorrente na indústria têxtil. Na indústria da lã, por exemplo, estas enzimas atuam facilitando na limpeza das fibras e controlando seu encolhimento no processo de tingimento, além de diminuir o encolhimento das fibras que pode acontecer no decorrer de sucessivas lavagens.

Proteases microbianas também são aplicadas como alternativas aos processos químicos comumente empregados no processamento da seda bruta, através das quais as enzimas removem, sob condições moderadas, as proteínas que interferem negativamente na qualidade do produto final (BISWAL *et al*., 2022).

De acordo com Sharma *et al.* (2019), a proteólise enzimática encontra aplicação também na recuperação de prata contida em filmes de raios-X e filmes fotográficos (1,5-2,0%, m/m). Estima-se que 25% da demanda global deste metal valioso seja suprida por processos de reciclagem, e que os resíduos fotográficos representam cerca de 75% do volume total de resíduos contendo prata que são recuperados. Nestes filmes, os sais de prata estão suspensos em uma emulsão proteica formada por gelatina. Logo, a hidrólise da gelatina por proteases ocasiona a liberação da prata, que pode ser então recuperada e posteriormente reutilizada.

Da mesma forma, proteases microbianas são úteis nos setores de cosméticos, produtos farmacêuticos e medicina. Estas enzimas podem ser utilizadas como agentes de depilação, como esfoliantes para pele, na eliminação de calosidades, na degradação de príons, no tratamento para acne, no aumento da permeabilidade da lâmina ungueal para melhor penetração de drogas usadas no tratamento tópico de doenças das unhas, em géis e bandagens empregadas no tratamento de queimaduras e ferimentos, na dissolução de trombos (coágulos) sanguíneos, dentre outras aplicações de grande relevância (SINGH; BAJAJ, 2017; SRIVASTAVA *et al*., 2020).

Além disto, reporta-se a adição de enzimas proteolíticas microbianas como suplementos em rações. Estas proteases (exógenas), ao complementar a atuação das enzimas do próprio animal (endógenas) durante o trânsito dos alimentos pelo seu trato digestivo, exercem efeitos positivos sobre a digestibilidade dos constituintes proteicos da ração. Como resultado, há maior disponibilidade de nutrientes passíveis de absorção, propicia-se, por exemplo, a melhoria da produção de carne e de leite (MENEZES *et al*., 2021; SOLANKI *et al*., 2021).

A indústria de alimentos também é beneficiada pela utilização de proteases obtidas de microrganismos. Diversas enzimas proteolíticas, com diferentes especificidades, são empregadas para aumentar a maciez de carnes, coagulação de proteínas (caseínas) do leite para produção de queijos, modulação das propriedades mecânicas e plásticas do glúten em produtos de panificação, redução do potencial alergênico de proteínas alimentares, assim como na melhoria das características tecnológicas/funcionais de proteínas utilizadas na produção de alimentos. Também podem ser utilizadas para elevação da solubilidade, da capacidade de formação de géis, e também de propriedades como a formação e estabilização de espumas e emulsões (TAVANO *et al*., 2018; SOUZA *et al*., 2023).

Estudos estão sendo comumente dedicados, particularmente, ao uso de enzimas proteolíticas para a obtenção de hidrolisados proteicos. Em parte, isto se deve às diversas atividades biológicas que os hidrolisados podem apresentar (AKBARIAN *et al*., 2022; BHANDARI *et al*., 2020).

Propriedades antitumorais, hipocolesterolêmicas, antidiabéticas, anti-hipertensivas, antioxidantes, antimicrobianas, entre outras, incluindo efeitos *in vivo*, são reportadas para hidrolisados obtidos a partir de diferentes substratos proteicos. Estes hidrolisados atraem especial atenção da indústria de alimentos, bem como da indústria farmacêutica e de setores relacionados à saúde humana (AKBARIAN *et al*., 2022; BHANDARI *et al*., 2020).

2.2 HIDROLISADOS PROTEICOS E POTENCIAL ANTIOXIDANTE

Hidrolisados proteicos são constituídos por peptídeos e aminoácidos derivados da hidrólise de proteínas e/ou substratos ricos em proteínas. As atividades biológicas nos hidrolisados são superiores àquelas potencialmente demonstradas pelas proteínas/substratos íntegros, indicando que a proteólise é necessária para

que estes fenômenos ocorram. Em outras palavras, as bioatividades observadas nos hidrolisados proteicos estão relacionadas aos peptídeos neles contidos. Neste sentido, peptídeos bioativos são definidos como sequências de aminoácidos que exibem bioatividades somente após serem liberados a partir das proteínas precursoras (SÁNCHEZ; VÁZQUEZ, 2017; TADESSE; EMIRE, 2020).

O potencial antioxidante situa-se entre as bioatividades mais exploradas em hidrolisados proteicos e peptídeos, com propriedades que podem derivar, por exemplo, da habilidade dos peptídeos em neutralizar radicais livres. Estes radicais são inevitavelmente produzidos por vários processos fisiológicos; contudo, quando os sistemas endógenos do organismo não são eficientes em sua eliminação, os radicais podem gerar danos a macromoléculas (LIU *et al*., 2016; ZOU *et al*., 2016).

Ainda, a manutenção deste desequilíbrio, conceituado como estresse oxidativo, está relacionada ao processo de envelhecimento, mas especialmente ao surgimento e à progressão de diversas doenças degenerativas e crônicas, incluindo desordens como a aterosclerose, diabetes e câncer. Logo, a capacidade de hidrolisados proteicos em eliminar radicais livres indica a relevância da capacidade antioxidante na perspectiva fisiológica (LIU *et al*., 2016; ZOU *et al*., 2016).

Nwachukwu e Aluko (2019) descrevem que a atividade antioxidante pode também resultar da habilidade dos hidrolisados proteicos e peptídeos em inibir a peroxidação de lipídios, reduzindo moléculas oxidadas e/ou quelando íons metálicos. Íons ferrosos (Fe^{2+}), por exemplo, atuam catalisando a produção de radicais fortemente oxidativos, como os radicais hidroxila que atuam na desestabilização de moléculas orgânicas e favorecem a oxidação lipídica.

Hidrolisados antioxidantes também são de interesse para a indústria de alimentos. Reações de oxidação, mais comuns em alimentos processados e ricos em gordura, prejudicam a qualidade destes produtos e podem originar moléculas perigosas à saúde humana. Desta forma, a aplicação de hidrolisados proteicos antioxidantes pode fornecer maior estabilidade aos alimentos, além de representar uma alternativa aos antioxidantes sintéticos atualmente utilizados e que estão associados a efeitos negativos sobre a saúde humana (TADESSE; EMIRE, 2020).

Ademais, hidrolisados antioxidantes podem favorecer o desenvolvimento de ingredientes e suplementos alimentares visando atender à crescente demanda dos consumidores por produtos naturais e saudáveis (MILLAN *et al*., 2022).

A capacidade antioxidante dos peptídeos contidos nos hidrolisados está relacionada à sua extensão e massa molecular, geralmente apresentando 3-6 aminoácidos e 400-650 Da, respectivamente. Contudo, peptídeos antioxidantes são descritos em faixas mais amplas de tamanho (2 a 100 aminoácidos) e de massa (0,4 a 3,0 kDa) (ZOU *et al*., 2016; NWACHUKWU; ALUKO, 2019; CZELEJ *et al*., 2020).

Apesar disso, os tipos de aminoácidos que constituem o peptídeo, bem como sua ordenação no peptídeo, aparentam ser características mais relevantes na definição de sua capacidade antioxidante. Aminoácidos hidrofóbicos, por exemplo, costumam conferir maior atividade antioxidante; no entanto, a presença de aminoácidos hidrofílicos, ao fornecer caráter anfipático ao peptídeo, pode facilitar sua interação com os radicais a serem neutralizados (ZOU *et al*., 2016; NWACHUKWU; ALUKO, 2019; CZELEJ *et al*., 2020).

2.2.1 Produção de hidrolisados proteicos antioxidantes

Processos químicos, microbianos e enzimáticos vêm sendo utilizados como estratégias para a hidrólise de proteínas, visando à produção de hidrolisados bioativos. A hidrólise enzimática é a mais explorada tecnologicamente, o que se justifica pela maior eficiência e pela elevada especificidade dos biocatalisadores. Além disso, a hidrólise ocorre em condições moderadas (temperatura e pH), gera poucos subprodutos indesejados e proporciona melhor controle dos processos hidrolíticos, o que contribui para a padronização dos hidrolisados proteicos obtidos (LORENZO *et al*., 2018; CZELEJ *et al*., 2020; DU; LI, 2022).

Destaca-se que tanto o substrato proteico quanto a especificidade das enzimas usadas na hidrólise são os principais fatores que definem as atividades biológicas dos hidrolisados proteicos, visto que atuam determinando os peptídeos liberados. Em relação aos substratos proteicos, proteínas alimentares de origem animal, como aquelas do leite, ovos, carnes e pescado, e proteínas de origem vegetal, como aquelas da soja, milho, trigo e outros grãos e sementes, estão passando a ser especialmente citadas como fontes de peptídeos biologicamente ativos (TAVANO *et al*., 2018; DAROIT; BRANDELLI, 2021).

Mais recentemente, resíduos e subprodutos de origem animal e vegetal, produzidos em grandes quantidades por indústrias do setor agroalimentar, vêm sendo investigados como recursos convenientes para a obtenção de hidrolisados

proteicos e peptídeos biologicamente ativos (GÖRGÜÇ; GENÇDAĞ; YILMAZ, 2020; ETEMADIAN *et al*., 2021).

A obtenção de hidrolisados proteicos é usualmente realizada usando enzimas comerciais, sobretudo aquelas obtidas de microrganismos. Contudo, proteases microbianas não disponíveis comercialmente também vêm sendo avaliadas para esta finalidade. A produção de hidrolisados bioativos por via enzimática é comumente realizada em condições de temperatura e pH que favoreçam a atividade das enzimas proteolíticas. Ademais, fatores como a relação entre enzima (E) e substrato (S) (E/S; unidades de atividade enzimática/massa de substrato proteico) e o tempo de hidrólise também são elementos que exercem influência sobre as bioatividades dos hidrolisados proteicos (BRANDELLI; DAROIT, *no prelo*).

A atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos é geralmente detectada através de experimentos *in vitro*. Em relação à capacidade de neutralização de radicais, podem ser citados os ensaios que utilizam o radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-ácido sulfônico (ABTS) e o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). A eliminação desses radicais orgânicos sintéticos por moléculas antioxidantes é avaliada através da perda de sua coloração característica, que é mensurada em espectrofotômetro através da absorbância dos sistemas reacionais nos comprimentos de onda de 734 nm (ABTS) e 517 nm (DPPH) (XIAO *et al*., 2020).

Conforme Gulcin e Alwasel (2022), os ensaios que avaliam a capacidade de hidrolisados proteicos em quelar íons ferrosos também são empregados. Neste ensaio, uma fonte de Fe^{2+} ($FeSO_4$ ou $FeCl_2$) é misturada à ferrozina (agente quelante), formando complexos com absorbância máxima a 562 nm. Caso peptídeos presentes nos hidrolisados proteicos sejam capazes de quelar os íons Fe^{2+}, sua presença induzirá uma menor formação dos complexos Fe^{2+}-ferrozina, causando uma redução da absorbância do sistema reacional.

Ainda, o poder redutor de hidrolisados proteicos é avaliado como indicador de sua capacidade antioxidante. Utiliza-se, por exemplo, o ferricianeto de potássio como reagente férrico que, na presença de antioxidantes, pode ser reduzido à respectiva forma ferrosa (ferrocianeto de potássio). Caso isso ocorra, a subsequente adição de Fe^{3+} ($FeCl_3$) ocasionará a formação do corante Azul da Prússia, que é mensurada a 700 nm em espectrofotômetro. Neste ensaio, quanto mais elevada a absorbância, maior a atividade antioxidante (MUNTEANU; APETREI, 2021).

2.3 UTILIZAÇÃO DE SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA DA CARNE E PESCADO

As cadeias produtivas da carne e do pescado, particularmente em estabelecimentos como abatedouros e frigoríficos, geram enormes quantidades de resíduos e subprodutos. Em termos gerais, estes subprodutos correspondem aos corpos inteiros de animais ou partes destes, ou outros produtos obtidos de animais, que podem, mas não se destinam diretamente ao consumo humano. Desta forma resíduos como sangue, ossos, peles, escamas, pelos, penas, cascos, chifres, cabeças, vísceras, órgãos internos, excretas e/ou conteúdo ruminal, enquadram-se como subprodutos da cadeia de produção de carne (LAFARGA; HAYES, 2014).

Martínez-Alvarez, Chamorro e Brenes (2015) afirmam que os subprodutos originados do abate e processamento para obtenção de carne de bovinos, suínos e frangos representem cerca de 49%, 44% e 37% do peso vivo destes animais, respectivamente. A quantidade de subprodutos pode alcançar aproximadamente 60% do peso vivo, no caso de peixes direcionados à produção de filés.

Embora alguns subprodutos (como fígado, rins, coração, intestinos, entre outros) sejam comestíveis – e o consumo destes subprodutos venha aumentando lenta e gradativamente no cenário mundial, em parte devido à constatação de seu valor nutricional (ALAO *et al*., 2017) –, sua utilização para fins alimentícios está majoritariamente relacionada a aspectos culturais, à tradição e à religião em diferentes partes do mundo, e mesmo às condições econômicas da população (BRAVO *et al*., 2023; TOLDRÁ; MORA; REIG, 2016).

Sendo assim, estima-se que mais da metade do peso do animal vivo não é apropriado para consumo humano, sendo considerado subproduto e/ou rejeito. A não utilização, ou a subutilização, de subprodutos (comestíveis ou não) de origem animal, associada à sua destinação inapropriada, pode resultar em sérios problemas ambientais, devido ao seu alto potencial poluidor. A chegada destes subprodutos aos ambientes acarreta em diversos impactos negativos, evidenciando-se o aumento nas demandas química e bioquímica de oxigênio, devido à sua elevada carga orgânica (BORRAJO *et al*., 2019).

Ainda, podem atuar na dispersão de patógenos e aumento da proliferação de vetores. No caso dos métodos tradicionais de manejo e tratamento destes subprodutos, como a incineração e a disposição em aterros, apresentam elevados

custos aos estabelecimentos geradores, e devem seguir rígidas normas regulatórias. Deste modo, diversas tecnologias foram e vêm sendo desenvolvidas no sentido de utilizar estas biomassas abundantes como matérias-primas para a obtenção de produtos úteis (MARTÍNEZ-ALVAREZ; CHAMORRO; BRENES, 2015; TIMORSHINA; POPOVA; OSMOLOVSKIY, 2022).

Na maioria dos casos, estes subprodutos são convertidos em insumos de baixo valor agregado. Neste cenário enquadram-se especialmente a produção de rações, fertilizantes, bem como colas e adesivos. Ainda, dependendo da liberação de agências reguladoras, subprodutos comestíveis de origem animal podem ser incorporados como ingredientes em alimentos processados. A produção de biocombustíveis é uma alternativa para destinação dos subprodutos, como é o caso da obtenção de biodiesel a partir de reações de transesterificação química das gorduras animais (TOLDRÁ *et al*., 2012; LYNCH *et al*., 2018a; SHIRSATH; HENCHION, 2021).

No entanto, como estratégias mais aprimoradas de valorização destes subprodutos, podem ser citadas a extração de enzimas de uso biotecnológico (como proteases e lipases) a partir do trato digestivo de animais, e a extração de proteínas (como o colágeno) a partir da pele e ossos, com aplicações em indústria de alimentos, cosméticos e no setor biomédico (TOLDRÁ *et al*., 2012; LYNCH *et al*., 2018a; SHIRSATH; HENCHION, 2021).

Mais especificamente, os subprodutos de origem animal apresentam elevada quantidade de proteínas. A fração orgânica de ossos (30-35%, m/m), por exemplo, é representada majoritariamente por proteínas (~95%) (BARAKAT *et al*., 2009). Da mesma forma, o teor de proteínas em vísceras e órgãos abdominais e torácicos de mamíferos é de aproximadamente 15-20% (m/m), em base úmida (MULLEN; ÁLVAREZ, 2016). Em base seca, o conteúdo de proteína nestes subprodutos, derivados de bovinos e suínos, por exemplo, varia entre 60% e 85% (m/m) (SEONG *et al*., 2014; BIEL; CZERNIAWSKA-PIATKOWSKA; KOWALCZYK, 2019; MAYSONNAVE *et al*., 2020).

Teores similares de proteína são reportados para vísceras e órgãos internos de frangos de corte (JAMDAR; HARIKUMAR, 2008; SEONG *et al*., 2015; HENRY *et al*., 2019); contudo, nas penas destes animais, a quantidade de proteínas atinge cerca de 90% (m/m) (LASEKAN; BAKAR; HASHIM, 2013). Em subprodutos do processamento de peixes, representados por vísceras, pele, escamas, cabeças, e

ossos/espinhaço, o conteúdo de proteínas varia de 30 a 70% (m/m), em base seca (ZHONG *et al*., 2016; KANDYLIARI *et al*., 2020; MALCORPS *et al*., 2021).

Estes subprodutos, por sua elevada concentração de proteínas, constituem-se como substratos teoricamente adequados para processos de proteólise enzimática e, desta forma, como recursos em potencial para a produção de hidrolisados e peptídeos biologicamente ativos (MORA *et al*., 2014).

Nesta perspectiva, hidrolisados proteicos e peptídeos configuram-se como produtos de elevado valor agregado. De fato, a possibilidade de obtê-los a partir de resíduos/subprodutos representa uma oportunidade para fortalecer a performance econômica da indústria da carne e, ao mesmo tempo, apresenta-se como uma estratégia relevante para reduzir os impactos causados ao meio ambiente, decorrente da sua destinação inadequada (LAFARGA; ÁLVAREZ; HAYES, 2017).

Portanto, investigações nesta temática enquadram-se como interessantes abordagens de biorrefinaria, onde biomassas abundantes, subutilizadas e de baixo valor comercial podem ser convertidas em importantes produtos (TIMORSHINA; POPOVA; OSMOLOVSKIY, 2022; BRAVO *et al*., 2023).

Deste modo, há a possibilidade de contribuir para uma visão circular da economia, cujos princípios estão diretamente relacionados à busca por uma maior sustentabilidade industrial, que inclui o setor alimentício, com ênfase na produção de carnes (TIMORSHINA; POPOVA; OSMOLOVSKIY, 2022; BRAVO *et al*., 2023).

2.3.1 Obtenção de hidrolisados proteicos antioxidantes a partir de subprodutos de origem animal

Os subprodutos oriundos de frigoríficos e abatedouros vêm sendo utilizados com êxito na obtenção de hidrolisados proteicos com capacidade antioxidante. Embora enzimas comerciais de origem animal ou vegetal sejam também aplicadas para este propósito (HASSAN *et al*., 2019; LÓPEZ-PEDROUSO *et al*., 2020; TEDESCHI *et al*., 2021), as proteases mais utilizadas na produção de hidrolisados antioxidantes são aquelas de origem microbiana. Neste panorama, destacam-se as preparações enzimáticas Alcalase (derivada de *Bacillus licheniformis*), Protamex (derivada de *Bacillus* sp.), Neutrase (derivada de *Bacillus amyloliquefaciens*), e Flavourzyme (derivada de *Aspergillus oryzae*) (Tabela 1).

Tabela 1. Hidrolisados proteicos antioxidantes produzidos a partir de subprodutos de origem animal usando proteases microbianas comerciais.

Subproduto (origem)	Protease(s) comercial(is)*	Referência
Baço (suíno)	Alcalase	Han *et al*. (2014)
Cabeça (peixe, *Lophius vomerinus*)	Alcalase	Greyling; Bordoloi; Goosen (2021)
Cabeças (peixes, *Oncorhynchus mykiss* e *Salmo salar*)	Alcalase	Vázquez *et al*. (2019)
Cólon (suíno)	Protamex + Alcalase	Damgaard *et al*. (2014)
Escamas (peixe, *Hypophthalmichthys molitrix*)	Alcalase; Flavourzyme	Lu; Luo; Feng (2014)
Fígado (suíno)	Alcalase; Flavourzyme	López-Pedrouso *et al*. (2020)
Ossos (suíno)	Neutrase	Pagán; Benítez; Ibarz (2021)
Ossos (peixe, *Aristichthys nobilis*)	Alcalase; Protamex	Zhang; Dong; Dai (2021)
Pâncreas (suíno)	Protamex + Alcalase	Damgaard et al. (2014)
Pele (suíno)	Alcalase	Hong; Min; Jo (2019)
Pele (peixe, *Oncorhynchus mykiss*)	Alcalase; Flavourzyme	Yaghoubzadeh *et al*. (2020)
Pelos (bovino)	Alcalase	Zeng *et al*. (2015)
Penas (farinha; frango)	Alcalase	Hong *et al*. (2022)
Pulmões (suíno)	Protamex + Alcalase	Damgaard *et al*. (2014)
Resíduos de filetagem (peixes, *Oncorhynchus mykiss* e *Salmo salar*)	Alcalase	Vázquez *et al*. (2019)
Sangue (suíno)	Alcalase	Verma *et al*. (2019)
Vísceras (farinha; frango)	Alcalase; Neutrase; Flavourzyme	Aguilar; Souza; Castro (2020)

(*continua*)

Tabela 1. *Continuação*.

Subproduto (origem)	Protease(s) comercial(is)*	Referência
Vísceras (ovino)	Alcalase	Meshginfar *et al*. (2014)
Vísceras (peixe, *Oreochromis* spp.)	Alcalase	Gómez *et al*. (2019)
Vísceras (peixe, *Thunnus albacores*)	Protamex	Pezeshk *et al*. (2019)

Adicionalmente, diversos estudos descrevem as potencialidades de proteases microbianas alternativas, não-comerciais, na obtenção de hidrolisados antioxidantes a partir de subprodutos de origem animal (Tabela 2). Estas proteases são, majoritariamente, enzimas extracelulares produzidas por isolados bacterianos mesofílicos, e geralmente apresentam atividade máxima em temperaturas entre 40 e 60 °C, e em pHs entre 7,0 e 9,0 (BRANDELLI; DAROIT, *no prelo*).

Tabela 2. Hidrolisados antioxidantes obtidos a partir de subprodutos de origem animal usando proteases microbianas não-comerciais.

Subproduto (origem)	Microrganismo(s) fonte de protease	Referência
Cabeças (camarão)	*Paenibacillus elgii* TKU051	Lee *et al*. (2021)
Cabeças (peixe, *Scorpaena notata*)	*Penicillium digitatum*	Aissaoui; Abidi; Marzouki (2015)
Carne residual da produção de salsichas (frango)	*Bacillus mojavensis* SA	Hammami *et al*. (2018)
Cascas de camarão	*Bacillus cereus* SV1	Manni *et al*. (2010)
Cascas de camarão	*Paenibacillus elgii* TKU051	Lee *et al*. (2021)
Escamas (colágeno; peixe, *Sparus aurata*)	*Pseudoalteromonas* sp. SJN2	Yang *et al*. (2017)
Fígado (suíno)	*Monascus purpureus*	Yu *et al*. (2017)

(*continua*)

Tabela 2. *Continuação*.

Subproduto (origem)	Microrganismo(s) fonte de protease	Referência
Ossos (colágeno; bovino)	*Anoxybacillus caldiproteolyticus* 1A02591 (expressa em *Escherichia coli*)	Cheng *et al*. (2021)
Ossos (gelatina; peixe, *Pangasius sutchi*)	*Lactobacillus plantarum S31*	Atma; Fitriani; Mustopa (2021)
Pele (colágeno; peixe, *Salmo salar*)	*Vibrio* sp. SQS2-3	Wu *et al*. (2018)
Pele (colágeno; suíno)	*Pseudoalteromonas* sp. H2	Liu *et al*. (2019)
Pele (peixe, *Gadous macrocephaius*)	*Pseudoalteromonas* sp. SM9913	Chen *et al*. (2017)
Pelos (suíno)	*Thermoactinomyces vulgaris* TK1-21	Kaewsalud *et al*. (2023)
Penas (farinha; frango)	*Bacillus haynesii* ALW 2	Emran; Ismail; Abdel-Fattah (2020)
Penas (frango)	*Thermoactinomyces vulgaris* TK1-21	Kaewsalud *et al*. (2023)
Resíduos da produção de surimi (peixe, *Nemipterus* spp.)	*Virgibacillus* sp. SK33	Wiriyaphan *et al*. (2015)
Tendões (colágeno; bovino)	*Alcaligenes odorans* BL-11	Banerjee; Suseela; Shanthi (2012)
Vísceras (peixe, *Sardina pilchardus*)	*Saccharomyces pastorianus*	Vieira *et al*. (2017)

O interesse acerca das proteases microbianas, alicerçado sobre a diversidade bioquímica e catalítica destas enzimas, vêm ganhando crescente destaque, visto que representa abordagem de cunho inovador, vislumbrando aplicações tecnológicas. Os resultados promissores descritos nestas investigações estimulam contínuas investidas direcionadas à prospecção de enzimas proteolíticas microbianas (BRANDELLI; DAROIT, *no prelo*).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PRODUÇÃO DE PROTEASE

A bactéria *Bacillus* sp. CL18 foi utilizada na obtenção das proteases. Tal cepa bacteriana foi isolada do solo de área urbana e demonstrou competência para degradação de penas quando cultivado em meio mineral (30 °C, pH 7,0) contendo uma única pena como único substrato orgânico (DE OLIVEIRA *et al*., 2017).

Os inóculos foram preparados usando a biomassa bacteriana coletada de cultivos em placas de Ágar Padrão para Contagem (PCA; 30 °C, 24 h). Posteriormente, a biomassa foi adicionada a solução salina estéril (8,5 g/L NaCl) e a absorbância (Abs) ajustada para 1,0 unidade a 600 nm.

A produção destas enzimas ocorreu por meio de cultivos realizados em meio mineral (K_2HPO_4, 0,3 g/L; KH_2PO_4, 0,4 g/L; NaCl, 0,5 g/L) contendo escamas de peixe (30 g/L) e penas de frango moídas (5 g/L). O pH inicial dos meios foi ajustado a 7,5 previamente à autoclavação (121 °C, 15 min).

Por fim, frascos Erlenmeyer, contendo 50 mL de meio para produção de protease, foram inoculados com 1 mL da suspensão bacteriana e incubados (30 °C; 125 rpm) por até 5 dias. Periodicamente (a cada 24 h), cultivos foram removidos em duplicata, centrifugados (10.000 × *g*, 10 min), e os sobrenadantes então avaliados quanto à atividade proteolítica.

3.1.1 Detecção da atividade proteolítica

A produção de proteases foi determinada empregando o substrato enzimático azocaseína. Os sobrenadantes dos cultivos (proteases brutas; 10 µL) foram adicionados a 190 µL de tampão Tris-HCl (100 mM; pH 8,0) e 300 µL de azocaseína (10 g/L, preparada no mesmo tampão). Após 15 min a 55 °C, as reações foram cessadas usando 600 µL de ácido tricloroacético (100 g/L). Em seguida o material era submetido a centrifugação (10.000 × g, 10 min), e deste, coletava-se 800 µL dos sobrenadantes, posteriormente misturados a 200 µL de NaOH (1,8 N).

A absorbância (Abs) foi mensurada a 420 nm no espectrofotômetro. Uma unidade de atividade proteolítica (U) foi definida como a quantidade de enzima a aumentar em 0,1 unidade a absorbância a 420 nm. Estes ensaios foram realizados

em triplicata. O sobrenadante do tempo de cultivo onde observou-se a maior atividade proteolítica foi usado nos experimentos de hidrólise.

3.2 SUBPRODUTOS DO SETOR DE PRODUÇÃO DE CARNES

Os subprodutos utilizados como substratos para a hidrólise enzimática foram: (I) farinha de ossos; (II) penas de frango; (III) escamas de tilápia; (IV) resíduos do corte de carnes e ossos bovinos em serra-fita; (V) fígado bovino; (VI) fígado de frango; (VII) pulmões bovinos; (VIII) pulmões suínos; (IX) rins bovinos; (X) rins suínos; (XI) vísceras de tilápia; e (XII) espinhaço de salmão, com carne residual aderida do processo de filetagem. Com exceção da farinha de ossos (I), adquirida na forma de produto comercial (com indicação para uso na adubação, porém de baixo custo), os demais subprodutos (II-XII) foram gentilmente cedidos por abatedouros/açougues/produtores locais.

O subproduto I não foi submetido a qualquer processamento. Os subprodutos II e III foram submetidos a secagem (80 °C; 24 h), triturados, e mantidos sob refrigeração até seu uso. Para os subprodutos de IV-XII, inicialmente realizou-se a trituração com água destilada (1:1).

Em seguida, os subprodutos de IV-XII foram submetidos a tratamento térmico (90 °C; 20 min) para inativação de enzimas endógenas (BOUGATEF *et al*., 2010). Após resfriamento, o material foi acondicionado em béqueres e congelado (-18 °C) para facilitar a separação de gordura e sua remoção das amostras (LONDOÑO-ZAPATA *et al*., 2022). Subsequentemente, os materiais processados foram descongelados e submetidos à hidrólise enzimática.

3.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DOS SUBPRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL

Em frascos Erlenmeyer, os subprodutos processados (1,25 g) tiveram adição de tampão Tris-HCl (100 mM; pH 8,0; 5 mM Ca^{2+}), de modo a atingir concentração final de 50 g/L em um volume total de 25 mL.

Após pré-incubação (52,5 °C; 20 min), as reações de hidrólise foram iniciadas pela adição da protease bruta (5% v/v; 1,25 mL; 1.075 U), atingindo 860 U/g substrato. As incubações ocorreram a 52,5 °C, por 4 h, em banho-maria com agitação recíproca.

As reações foram finalizadas por fervura (20 min) e, após resfriamento e centrifugação (10.000 × *g*, 30 min), os sobrenadantes foram coletados. Estes sobrenadantes, denominados de hidrolisados, foram então avaliados quanto à concentração de proteínas solúveis e potenciais atividades antioxidantes.

Os controles das hidrólises foram realizados utilizando a protease inativada termicamente (100 °C; 10 min). Todos os experimentos de hidrólise, incluindo os controles, foram realizados em triplicatas.

3.4 CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS NOS HIDROLISADOS

A concentração de proteínas solúveis foi determinada através do método Folin-fenol (LOWRY et al., 1951). Inicialmente, foram preparadas as soluções “A” (carbonato de sódio, 20 g/L; tartarato de sódio e potássio, 0,2 g/L; e NaOH 2 M, 50 mL/L) e “B” (sulfato de cobre, 5 g/L), para então produzir a solução “C” (50 partes de “A”:1 parte de “B”).

Para os ensaios, usou-se 2,5 mL da solução “C” e 100 µL dos hidrolisados (ou controles), diluídos em água destilada se necessário. Após incubação no escuro por 15 min, foram adicionados 300 µL do reagente de Folin-Ciocalteu (1 N). Passados 30 min, a absorbância (Abs) foi mensurada em espectrofotômetro a 750 nm. Os testes em branco foram realizados usando água destilada (100 µL). Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A curva padrão de albumina sérica bovina (1 mg/mL) foi preparada para interpretação dos resultados de Abs.

3.5 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTES DOS HIDROLISADOS

O potencial antioxidante foi avaliado por meio de quatro métodos, em triplicatas, conforme descrito nas seções a seguir.

3.5.1 Captura do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

A solução do radical DPPH (60 µM) foi preparada em metanol (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). Em ambiente escuro, a alíquota

dos hidrolisados/controles (25 µL) foi adicionada a 1 mL da solução de DPPH. Após homogeneização, e seguindo-se incubação por 12 h no escuro e em temperatura ambiente, a Abs foi mensurada a 517 nm.

Os testes em branco foram preparados com água destilada em substituição às amostras. Os resultados foram expressos como:

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

3.5.2 Captura do radical 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS)

Inicialmente, a solução do radical catiônico ABTS foi preparada através da reação de 5 mL de solução de ABTS (7 mM), com 88 µL de solução de $K_2S_2O_8$ (140 mM). Esta solução permaneceu no escuro, em temperatura ambiente, por 12-16 h antes do uso.

Para os ensaios, a solução do radical ABTS foi diluída em tampão fosfato salino (5 mM; pH 7,4) até atingir absorbância (Abs) de 0,70 ± 0,02 a 734 nm. Amostras dos hidrolisados/controles (10 µL) foram adicionadas a 1 mL da solução diluída do radical ABTS e a Abs a 734 nm foi mensurada após 10 min (RE *et al*., 1999). Testes em branco foram realizados utilizando água destilada no lugar das amostras. Os resultados foram expressos como:

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

3.5.3 Atividade quelante de Fe^{2+}

Hidrolisados/controles (100 µL) foram misturados a 3,7 mL de água destilada e 100 µL de $FeSO_4$ (2 mM). Após 5 min, foram adicionados 200 µL de ferrozina (3-(2-piridil)-5,6-bis-(4-ácido fenil sulfônico)-1,2,4-triazina; 5 mM). A Abs foi mensurada a 562 nm após 10 min (CHANG; WU; CHIANG, 2007). Testes em branco foram preparados com água destilada no lugar das amostras. Os resultados foram expressos como:

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

3.5.4 Poder redutor

Hidrolisados/controles (1 mL) foram adicionados a 2,5 mL de tampão fosfato de sódio (200 mM; pH 6,6) e 2,5 mL de ferricianeto de potássio (10 g/L). Após incubação (50 °C; 20 min), adicionou-se 2,5 mL de ácido tricloroacético (100 g/L) e esta mistura foi centrifugada (3.000 × *g*; 10 min).

O sobrenadante (2,5 mL) foi então adicionado de 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de $FeCl_3$ (1 g/L). Subsequentemente realizou-se a leitura da Abs a 700 nm (Abs700) (ZHU; ZHOU; QIAN, 2006). Testes em branco foram realizados usando água no lugar da amostra. Os resultados foram expressos como:

$$Abs700 = (Abs_{amostra} - Abs_{branco})$$

3.6 SELEÇÃO DE SUBSTRATO E EFEITOS DE VARIÁVEIS SOBRE O POTENCIAL ANTIOXIDANTE

O substrato mais promissor, em termos das bioatividades avaliadas, foi selecionado para mais testes, visando avaliar o efeito do tempo de hidrólise e da relação E/S sobre as atividades antioxidantes dos hidrolisados.

As hidrólises ocorreram de forma análoga àquelas previamente realizadas (seção 3.3). O subproduto escolhido (50 g/L), em tampão Tris-HCl, foi inicialmente pré-incubado. As hidrólises foram iniciadas pela adição da protease bruta (480, 1.075 e 1.750 U), equivalente a relações E/S de 384, 860 e 1.400 U/g, respectivamente.

As incubações ocorreram a 52,5 °C, por 0-8 h. Frascos foram sacrificados, em duplicata, em diferentes tempos (t; min) de hidrólise (0, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480 min). As reações foram finalizadas por fervura e, após centrifugação, os sobrenadantes (hidrolisados) foram coletados e avaliados quanto à concentração de proteínas solúveis (seção 3.4) e atividades antioxidantes (seção 3.5).

3.7 ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados das replicatas são apresentados como média ± desvio padrão. Comparações entre médias foram realizadas pelo teste de Tukey e consideradas distintas se $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PRODUÇÃO DE PROTEASE POR *Bacillus* SP. CL18

Cultivos submersos de *Bacillus* sp. CL18 foram realizados em meio de cultura contendo escamas de peixe (30 g/L) e penas de frango (5 g/L) como substratos orgânicos. Neste meio, a produção de protease foi incrementada até o 4º dia de cultivo, onde as máximas atividades foram observadas ($p < 0.05$; Fig. 1), reiterando estudos prévios (BERNARDO; KOPPLIN; DAROIT, 2023). A protease bruta (~860 U/mL) foi coletada e avaliada quanto à hidrólise de subprodutos de origem animal.

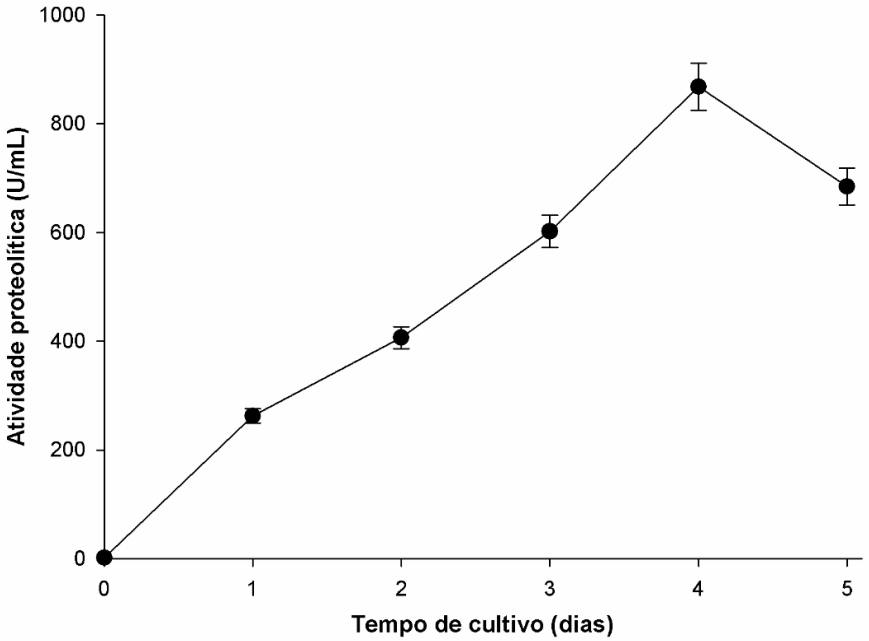

Figura 1 – Produção de protease por *Bacillus* sp. CL18.

4.2 HIDRÓLISE DE SUBPRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL

A concentração de proteínas solúveis foi superior após 4 h de atuação da protease, quando comparada àquela mensurada nos controles ($p < 0,05$; Fig. 2). Os maiores aumentos, em relação aos valores nos controles, foram observados para hidrolisados de pulmão bovino (2,07 mg/mL), seguidos de pulmões suínos (1,65 mg/mL), e espinhaço de peixe e rins suínos (1,52 mg/mL), enquanto que os menores incrementos foram detectados em hidrolisados de vísceras de peixe (0,51 mg/mL) e penas moídas (0,67 mg/mL) (Fig. 2).

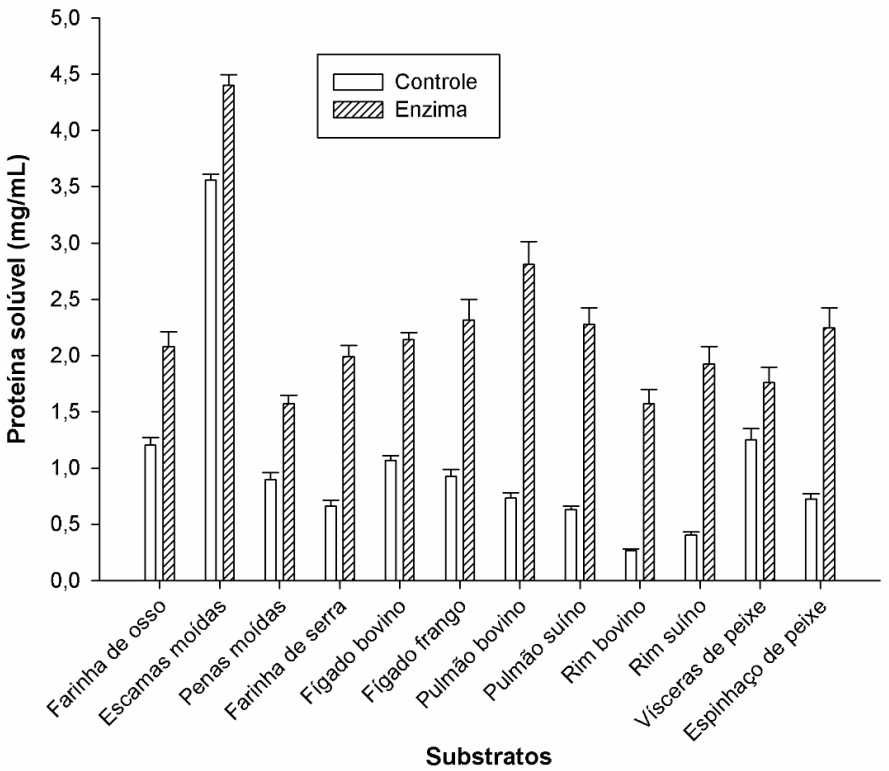

Figura 2 – Incremento da concentração de proteínas solúveis pela ação da protease bruta de *Bacillus* sp. CL18 sobre subprodutos de origem animal em relação aos seus respectivos controles. Todos os hidrolisados (enzima) apresentaram concentrações superiores em relação aos respectivos controles ($p < 0,05$).

Estes resultados indicam que houve liberação de peptídeos de menor massa a partir dos substratos (CHAN *et al*., 2022; GHANBARINIA *et al*., 2022), como também reportado para a hidrólise de subprodutos de carne bovina por diferentes proteases comerciais (TEDESCHI *et al*., 2021), para a hidrólise de farinha de penas por uma protease de *Bacillus* sp. P45 (CUNHA *et al*., 2023) e para a hidrólise de gelatina por uma protease de *Paenibacillus* sp. TKU052 (DOAN *et al*., 2020).

A liberação de peptídeos depende da especificidade da protease em relação ao substrato. O colágeno é a proteína majoritária em ossos (~95%) (BARAKAT *et al*., 2009), bem como em escamas de peixe, onde 50% de sua massa corresponde ao colágeno (SHALABY *et al*., 2020). Em fígados, rins e pulmões, o colágeno também é predominante, com menores teores de elastina (RIVERA *et al*., 2000; SIDDIQI; ALHOMIDA, 2003; LYNCH *et al*., 2018b; TRĘBACZ; BARZYCKA, 2023).

O colágeno está presente em quantidade elevada no estômago e intestino de peixes (HORN; ASPMO; EIJSINK, 2007; ABDELHEDI *et al*., 2016), embora em níveis menores do que em ossos e peles, por exemplo (PATEIRO *et al*., 2020). Em músculos, predominam proteínas miofibrilares como actina e miosina (50-55%; até 80% em peixes), seguidas por proteínas sarcoplasmáticas (25-34%), e colágeno e elastina (10-15%; ~3% em peixes) (AZADIAN; MOOSAVI-NASAB; ABEDI, 2012; LAFARGA; HAYES, 2014). Já nas penas de frango, o elevado teor proteico (~90%) é representado quase que totalmente por queratina (LASEKAN *et al*., 2013).

A protease bruta de *Bacillus* sp. CL18 é constituída por diversas enzimas proteolíticas (RIEGER *et al*., 2017). Neste sentido, proteases distintas em uma preparação bruta podem contribuir para incrementar a hidrólise de proteínas e, potencialmente, também a diversidade de peptídeos liberados a partir de substratos proteicos (NASRI *et al*. 2012).

Contudo, até então, a protease bruta de *Bacillus* sp. CL18 havia sido descrita como sendo capaz de hidrolisar, especialmente, caseína e proteína de soja (RIEGER *et al*., 2017; LERMEN; CLERICI; DAROIT, 2020). A habilidade desta preparação enzimática em atuar sobre outros substratos (Fig. 2) sugere maior versatilidade, que pode ser explorada na valorização de subprodutos da indústria da carne/pescado por meio da obtenção de hidrolisados proteicos.

4.3 POTENCIAL ANTIOXIDANTE DOS HIDROLISADOS

A produção de hidrolisados proteicos antioxidantes vem sendo amplamente descrita, considerando o potencial destes bioprodutos na contraposição aos efeitos nocivos que reações de oxidação podem exercer sobre a saúde humana e qualidade de alimentos (BORRAJO *et al*., 2019). Assim, os hidrolisados obtidos foram avaliados quanto aos seus potenciais antioxidantes *in vitro*.

A capacidade antirradical foi avaliada por meio de ensaios com os radicais DPPH e ABTS, que estão entre os mais utilizados para esta finalidade (ZHU *et al*., 2022). Ademais, os hidrolisados produzidos pela ação da protease bruta de *Bacillus* sp. CL18 exibiram maior eliminação ($p < 0,05$) dos radicais DPPH (Fig. 3) e ABTS (Fig. 4), quando comparados aos respectivos substratos não hidrolisados (controles).

Nos ensaios com o radical DPPH (Fig. 3), o maior incremento (5,4%) foi detectado para fígado de frango (9,5% nos controles; 14,9% nos hidrolisados), seguido dos hidrolisados de pulmão bovino (aumento de 5,1%), e pulmão suíno e espinhaço de peixe (aumento de 4,7%). Já as menores elevações foram observadas nos hidrolisados de farinha de ossos (aumento de 2,3%) (Fig. 3).

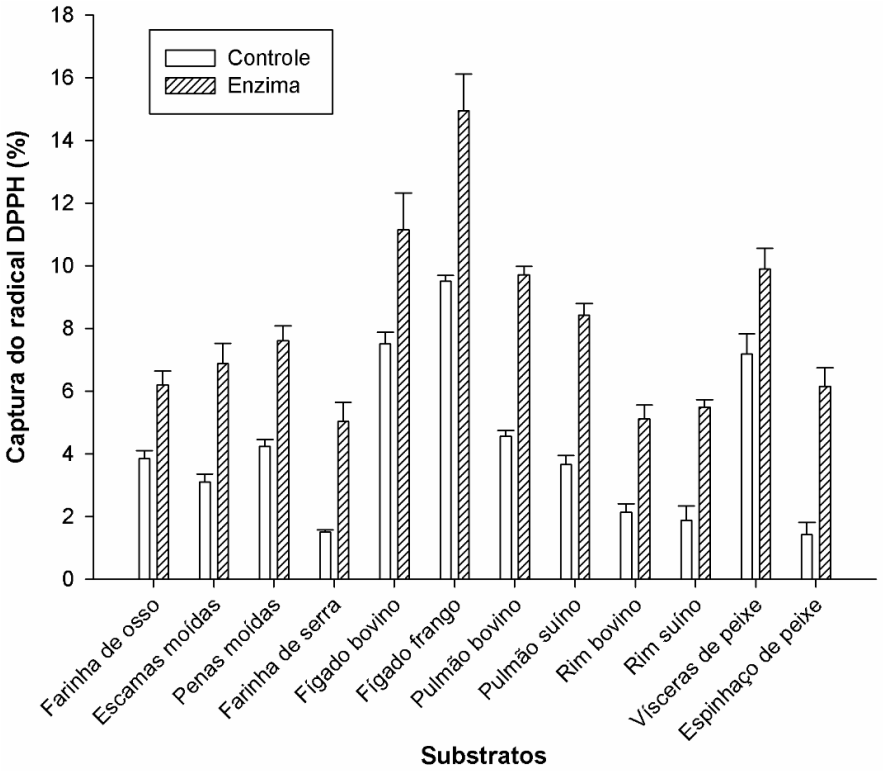

Figura 3 – Captura do radical DPPH por hidrolisados de subprodutos de origem animal e seus respectivos controles. Todos os hidrolisados (enzima) apresentaram capturas superiores do radical em relação aos respectivos controles ($p < 0,05$).

Em relação ao ensaio ABTS (Fig. 4), as maiores porcentagens de eliminação deste radical, em relação aos controles, foram de 54,4% nos hidrolisados de rins suínos (19,2% nos controles; 73,6% nos hidrolisados), e de 51,4% nos hidrolisados de espinhaço de peixe (8,7% nos controles; 60,1% nos hidrolisados). Incrementos de 47,7% e 47,4%, em relação aos controles, ocorreram em hidrolisados de rins bovinos e pulmões bovinos, respectivamente. Já o menor aumento (9,9%) foi observado para vísceras de peixe (46,6% nos controles; 56,5% nos hidrolisados) (Fig. 4).

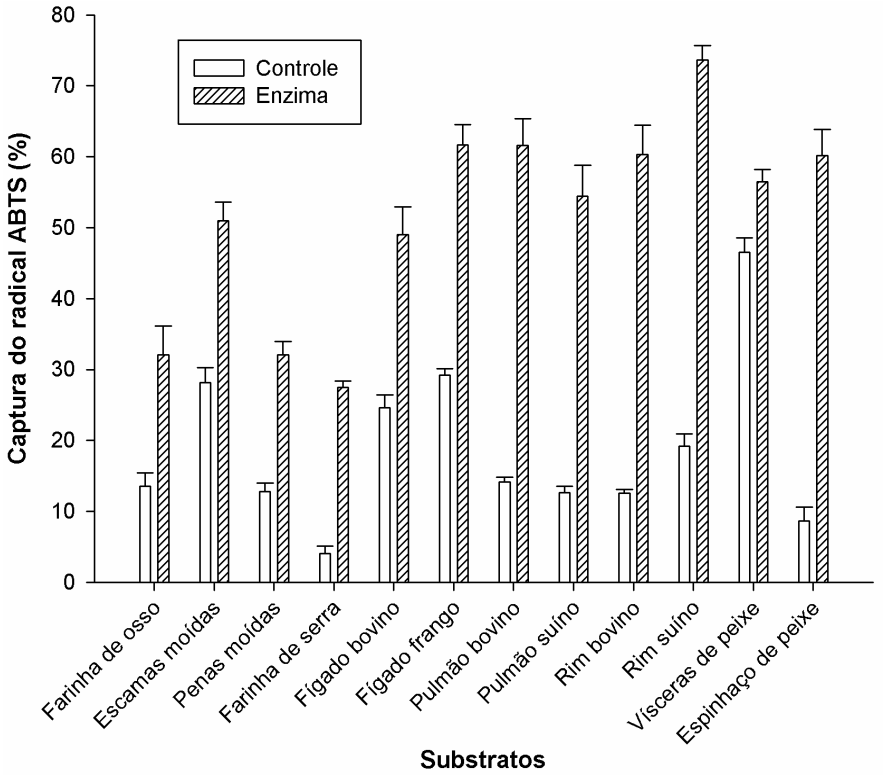

Figura 4 – Captura do radical ABTS por hidrolisados de subprodutos de origem animal e seus respectivos controles. Todos os hidrolisados (enzima) apresentaram capturas superiores do radical em relação aos respectivos controles ($p < 0,05$).

Os resultados (Fig. 3 e 4) indicam que peptídeos liberados dos subprodutos demonstraram a capacidade de transferir elétrons e, com isso, neutralizar os radicais DPPH e ABTS (ZHU *et al*., 2022). Embora mecanismos similares sejam responsáveis pela eliminação destes radicais, as diferenças detectadas nos resultados destes ensaios para um mesmo hidrolisado foram notáveis. Isso também é reportado por outros autores, sendo que a eliminação do radical ABTS é comumente superior àquela do radical DPPH (DAMGAARD *et al*., 2014).

O radical DPPH é solúvel em solventes orgânicos, enquanto que o radical ABTS é solúvel em meios aquosos e orgânicos. Ou seja, o potencial antioxidante de moléculas hidrofílicas e lipofílicas pode ser mensurado com o radical ABTS, indicando ser este um ensaio mais sensível do que ensaios com o radical DPPH na avaliação da capacidade antirradical de proteínas/peptídeos em meios aquosos (TANG *et al*., 2010), como é o caso dos hidrolisados obtidos neste estudo.

A atividade quelante de Fe^{2+} foi avaliada considerando a atuação destes íons metálicos como agentes pró-oxidantes. A capacidade de quelação colabora de modo

indireto para o potencial antioxidante, visto que, ao diminuir a disponibilidade de íons ferrosos, há menor probabilidade de estes participarem de reações que geram radicais prejudiciais (NWACHUKWU; ALUKO, 2019; GULCIN; ALWASEL, 2022).

Os hidrolisados obtidos demonstraram capacidade superior de quelação de Fe^{2+} quando comparados aos respectivos controles ($p < 0,05$; Fig. 5). Especificamente, a atividade quelante das penas moídas (29,0%) e da farinha de serra (50,0%) não hidrolisadas foram elevadas para 62,8% e 78,1% nos respectivos hidrolisados, representando os maiores aumentos nesta capacidade (33,8% e 28,1%, respectivamente). Contudo, incrementos de apenas ~8,8% foram observados em hidrolisados de rim suíno e vísceras de peixe (Fig. 5).

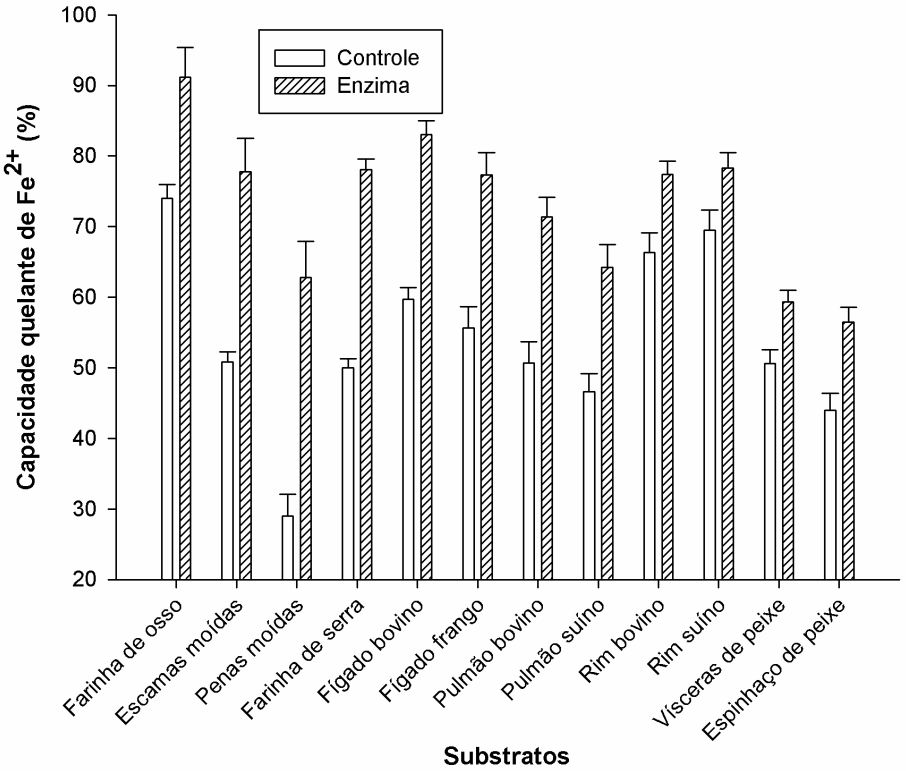

Figura 5 – Capacidade de quelação de Fe^{2+} por hidrolisados de subprodutos de origem animal e seus respectivos controles. Todos os hidrolisados (enzima) apresentaram quelações superiores em relação aos respectivos controles ($p < 0,05$).

A hidrólise dos subprodutos de origem animal pela protease bruta de *Bacillus* sp. CL18 também ocasionou aumento do poder redutor ($p < 0,05$) em comparação aos controles (Fig. 6). O poder redutor reflete a propriedade de moléculas em doar

elétrons, indicando capacidade de reduzir intermediários oxidados envolvidos, por exemplo, em processos de peroxidação lipídica (AGRAWAL; JOSHI; GUPTA, 2016).

Dentre os hidrolisados, os maiores acréscimos na Abs700 em relação aos controles (0,086 Abs700) foram observados para rim suíno (0,030 Abs700 nos controles; 0,116 Abs700 nos hidrolisados). Na sequência, incrementos de 0,083 Abs700 em comparação com os controles foram detectados em hidrolisados de pulmão bovino, e elevações de 0,078 Abs700 foram mensuradas em hidrolisados de penas moídas e fígado de frango. Contudo, a hidrólise de farinha de serra ocasionou incrementos de apenas 0,019 Abs700 (de 0,011 Abs700 nos controles para 0,030 Abs700 nos hidrolisados) (Fig. 6).

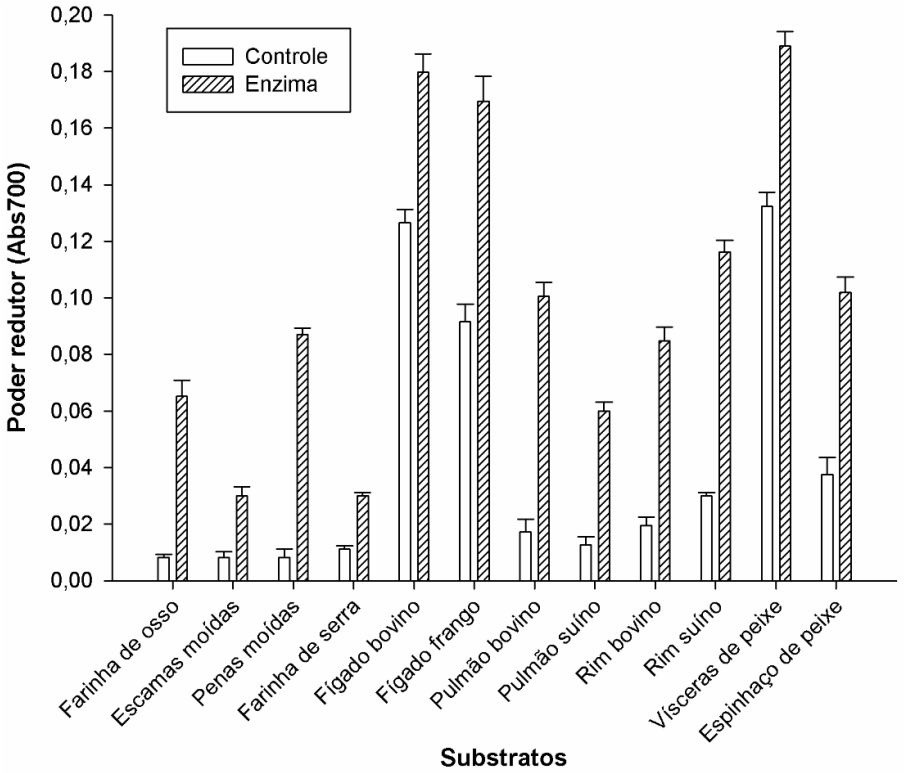

Figura 6 – Poder redutor mensurado em hidrolisados de subprodutos de origem animal e seus respectivos controles. Todos os hidrolisados (enzima) apresentaram poder redutor superior em relação aos respectivos controles ($p < 0,05$).

Complementarmente, as atividades antioxidantes dos hidrolisados (Figs. 3-6) não estiveram necessária e diretamente relacionadas com o conteúdo de proteínas solúveis (Fig. 2), indicando que as bioatividades dos hidrolisados proteicos estão associadas às propriedades dos peptídeos neles contidos (POWER; JAKEMAN; FITZGERALD, 2013; RIVERO-PINO; ESPEJO-CARPIO; GUADIX, 2020).

Comparações entre as atividades antioxidantes dos hidrolisados obtidos (Fig. 3-6) e resultados de outros estudos são dificultosos, devido, por exemplo, ao uso de métodos distintos e, particularmente, às variações nas condições em que um mesmo ensaio são realizadas (SAMARANAYAKA; LI-CHAN, 2011). No entanto, em subprodutos de origem animal, a principal fonte de compostos antioxidantes é representada pelos peptídeos liberados a partir da hidrólise das proteínas que os compõem (MARTÍ-QUIJAL *et al*., 2021).

Considerando substratos similares aos do presente estudo, a hidrólise de ossos e aparas dos peixes truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e salmão (*Salmo salar*) com a enzima comercial Alcalase (3 h) resultou em captura dos radicais DPPH e ABTS (VÁZQUEZ *et al*., 2019). Hidrolisados de misturas de músculos e peles dos peixes corvina e maria-luísa, produzidos com Alcalase ou Protamex (5 h) exibiram 24-31% de eliminação do radical DPPH (3,8 mg/mL no ensaio) (CAMARGO *et al*., 2021). A quelação de Fe^{2+} foi demonstrada para hidrolisados de ossos moídos de bacalhau obtidos com a enzima Protease P (HALLDORSDOTTIR *et al*., 2014).

A hidrólise de farinha de ossos de frango com Alcalase (2 h) ocasionou elevação da capacidade antioxidante, mensurada usando o radical ABTS (LONDOÑO-ZAPATA *et al*., 2022), e hidrolisados de ossos de frango produzidos com uma mistura de três proteases comerciais (papaína, tripsina e protease neutra; 3,5 h) apresentaram poder redutor e eliminação do radical DPPH (NIE *et al*., 2017).

A enzima comercial Neutrase foi aplicada na hidrólise de farinha de ossos (fêmur) suínos, e os hidrolisados resultantes exibiram capacidade de neutralizar o radical ABTS (PAGÁN; BENÍTEZ; IBARZ, 2021). Farinha de ossos bovinos (produto comercial), hidrolisada com uma protease comercial (3 h), demonstrou a habilidade de eliminar radicais ABTS (45,7%) e DPPH (42,8%) (ZHENG *et al*., 2021).

Escamas de carpa-prateada, submetidas à hidrólise com Flavourzyme, Alcalase ou papaína, apresentaram poder redutor, eliminação do radical DPPH e quelação de Fe^{2+} (LU; LUO; FENG, 2014). A atividade antioxidante de hidrolisados de escamas de *Lutjanus erythropterus*, obtidos com papaína, foi demonstrada por meio da captura de radicais (CHEN *et al*., 2020). Escamas de tilápia hidrolisadas com Alcalase também exibiram potencial antioxidante (SIERRA *et al*., 2021).

A farinha de serra é uma mistura de ossos e tecidos moles (músculos, gordura), resultante do corte de carcaças e peças de carcaças em abatedouros e açougues. Estas farinhas, denominadas também de “pó de serra”, apresentam

elevado teor proteico (KOCK; VAN RYSSEN; DAVIES, 1995; LIMA *et al*., 2022). Em relação ao uso de farinhas de serra como substratos à hidrólise enzimática, aquela obtida do corte de cavala (peixe) congelada foi submetida à ação de Alcalase, gerando hidrolisados com capacidade de capturar os radicais DPPH e ABTS, quelar Fe^{2+} e reduzir Fe^{3+} (LIMA *et al*., 2021).

A hidrólise de farinha de penas de frango com Alcalase (3 h) resultou em hidrolisados que exibiram poder redutor e eliminação dos radicais DPPH e ABTS (HONG *et al*., 2022). A hidrólise de farinha de penas comercial pelas enzimas Alcalase, Neutrase ou Flavourzyme (4 h) ocasionou incrementos na capacidade de capturar radicais DPPH e ABTS (JEAMPAKDEE *et al*., 2020).

Hidrolisados de vísceras de tilápia, produzidos com Alcalase, exibiram capacidade de capturar o radical DPPH, quelar Fe^{2+} e reduzir Fe^{3+} (SEPÚLVEDA; ZAPATA, 2020; SEPÚLVEDA *et al*., 2021). Em outros estudos, a hidrólise de vísceras de tilápia por Alcalase também resultou em atividades antioxidantes superiores em relação ao substrato não hidrolisado, conforme mensurado pela eliminação do radical DPPH (RIYADI *et al*., 2020), e também pela neutralização do radical ABTS, e habilidade de reduzir Fe^{3+} (GÓMEZ *et al*., 2019).

A produção de hidrolisados de fígados também é explorada. López-Pedrouso *et al*. (2022) indicaram a capacidade de Alcalase, Flavourzyme, papaína e bromelina na produção de hidrolisados de fígado suíno com grande potencial antioxidante, mensurada *in vitro* pela eliminação de radicais DPPH e ABTS, e redução de Fe^{3+}. Quanto ao fígado bovino, proteínas citoplasmáticas foram extraídas deste órgão e hidrolisadas com termolisina, resultando em aumento da capacidade de captura de radicais DPPH, quelação de Fe^{2+} e redução de Fe^{3+} (DI BERNARDINI *et al*., 2011).

Hidrolisados de fígado de frango, obtidos pela ação de tripsina, exibiram poder redutor e eliminação do radical DPPH superiores ao substrato não hidrolisado (XIONG *et al*., 2020). Chou *et al*. (2014) reportaram a eliminação do radical DPPH e quelação de Fe^{2+} por hidrolisados de fígado de frango produzidos com pepsina. Alcalase foi usada na hidrólise de fígado de frango, e os hidrolisados exibiram poder redutor, além da neutralização de radicais DPPH e ABTS (CHAKKA *et al*., 2015).

Informações sobre o potencial antioxidante de hidrolisados de rins e pulmões de animais de açougue são relativamente escassas. Uma mistura de pulmões, fígado e coração de cabra foi submetida à hidrólise com Alcalase ou papaína, resultando em hidrolisados com capacidade de eliminar radicais DPPH e ABTS

(QUEIROZ *et al*., 2017). O'Sullivan *et al*. (2017) avaliaram a produção de hidrolisados antioxidantes de pulmões bovinos usando papaína, pepsina e Alcalase.

Bechaux *et al*. (2020) detectaram o potencial antioxidante de hidrolisados de fígados e pulmões suínos produzidos com uma mistura de papaína e Subtilisina. Hidrolisados de rins e hidrolisados de fígado, obtidos com uma protease comercial, apresentaram captura superior dos radicais DPPH e ABTS em comparação aos substratos não hidrolisados (SAEED *et al*., 2020). Recentemente, Martinez *et al*. (2023) usaram uma mistura de Alcalase e Flavourzyme (1:1) para hidrolisar pulmões bovinos, sendo que os hidrolisados apresentaram capacidade superior de capturar radicais ABTS e DPPH e de reduzir Fe^{3+}, em relação a pulmões não hidrolisados.

Uma mistura de proteases comerciais (Alcalase e Protamex; 1:1) foi empregada na hidrólise (2 h) de pulmões bovinos e rins bovinos. A quelação de Fe^{2+} pelos hidrolisados de pulmões e rins foi de 55,0% e 63,4% (1,1 mg/mL nos ensaios), respectivamente; já a eliminação do radical ABTS atingiu 41,6% e 41,0%, respectivamente (10 µg/mL no ensaio) (DAMGAARD; LAMETSCH; OTTE, 2015).

Em estudo prévio, a capacidade quelante de hidrolisados de pulmões suínos, produzidos pela ação da mesma mistura de enzimas (2 h), atingiu 38% (0,55 mg/mL no ensaio), a eliminação do radical DPPH alcançou 9,7% (10 mg/mL no ensaio), e a captura do radical ABTS foi de 87,9% (10 µg/mL no ensaio). Usando as mesmas concentrações nos ensaios, hidrolisados de fígado suíno apresentaram quelação de Fe^{2+} igual a 92,0%, além da captura dos radicais DPPH (9,9%) e ABTS (79,2%) (DAMGAARD *et al*., 2014). Comparativamente, a efetiva concentração de proteínas solúveis nos ensaios realizados no presente trabalho com hidrolisados de fígados, rins e pulmões, foi de 0,04-0,07 mg/mL nos testes de quelação de Fe^{2+} e captura do radical DPPH, e de 7,8-13,9 µg/mL no teste de eliminação do radical ABTS.

Os estudos acima apresentados, ao mesmo tempo em que corroboram a relevância de subprodutos da indústria da carne/pescado como substratos para a produção de hidrolisados proteicos antioxidantes, reforçam o uso predominante de enzimas proteolíticas comerciais para tal finalidade. A aplicação de proteases microbianas não-comerciais vem sendo descrita visando obter hidrolisados antioxidantes a partir de proteínas do leite, ovos e carnes, além de soja e outros grãos, bem como de subprodutos do processamento de crustáceos e moluscos (BRANDELLI; DAROIT, *no prelo*).

Músculos, subprodutos e proteínas extraídas de subprodutos do processamento de peixes parecem ser mais investigados como substratos para a geração de hidrolisados antioxidantes por proteases não-comerciais. Uma mistura de resíduos da produção de surimi (ossos e peles de peixes *Nemipterus* spp.) foi hidrolisada pela protease bruta de *Virgibacillus* sp. SK33, resultando em maior capacidade de eliminar radicais ABTS, quelar Fe^{2+} e reduzir Fe^{3+} (WIRIYAPHAN *et al*., 2015). Hidrolisados de colágeno extraído de ossos de cavala, de escamas de pargo e de pele de salmão, obtidos com uma protease de *Pseudoalteromonas* sp. SJN2, apresentaram a capacidade de eliminar o radical DPPH (YANG *et al*., 2017).

A hidrólise de vísceras de sardinha pela protease intracelular de *Saccharomyces pastorianus* resultou em incrementos da capacidade de redução de Fe^{3+} e captura do radical DPPH (VIEIRA; PINHO; FERREIRA, 2017). Uma mistura de cabeças e vísceras de sardinha foi hidrolisada usando proteases brutas de *Aspergillus clavatus* ES1 e de *Bacillus licheniformis* NH1, originando hidrolisados capazes de eliminar radicais DPPH e de reduzir Fe^{3+} (BOUGATEF *et al*., 2010).

Wu *et al*. (2017) submeteram extratos proteicos, obtidos de pele e de músculos de salmão, à hidrólise por proteases brutas de 13 linhagens bacterianas (incluindo representantes dos gêneros *Aeromonas*, *Bacillus*, *Exiguobacterium*, *Paenibacillus*, *Photobacterium*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas* e *Vibrio*). A captura de radicais DPPH e a quelação de Fe^{2+} foram detectadas em todos os hidrolisados obtidos, com destaque para hidrolisados de proteínas musculares de salmão hidrolisados por *Pseudoalteromonas* sp. SQN1 (WU *et al*., 2017).

Músculos e cabeças do peixe *Scorpaena notata* foram hidrolisados por uma protease de *Penicillium digitatum*, e os hidrolisados exibiram captura do radical DPPH, poder redutor e quelação de Fe^{2+} (AISSAOUI; ABIDI; MARZOUKI, 2015). Atividades antioxidantes também foram detectadas em hidrolisados de músculos de carpa-prateada produzidos com a protease de *Planococcus maritimus* XJ11 (expressa em *Escherichia coli*) (LENG *et al*., 2023). Proteases de *Bacillus pumilus* A1, *Bacillus mojavensis* A21 (BEN KHALED *et al*., 2014), e de *Bacillus subtilis* A26 (JEMIL *et al*., 2017) hidrolisaram músculos de sardinha, resultando em maior poder redutor, capacidade de quelar Fe^{2+} e neutralizar radicais.

A neutralização de radicais DPPH e ABTS, além da redução de Fe^{3+}, foi reportada para hidrolisados de farinha de músculos de carpa-comum produzidos com a protease bruta de *Halobacillus andaensis* MQ (DELGADO-GARCÍA *et al*.,

2019). A eliminação do radical DPPH e a redução de Fe^{3+} foram detectadas em hidrolisados (3 h) de carne residual da produção de salsichas de frango, obtidos com a protease bruta de *Bacillus mojavensis* AS (HAMMAMI *et al*., 2018).

Hidrolisados com capacidade antioxidante foram produzidos a partir de colágeno extraído de tendões bovinos usando proteases de *Alcaligenes odorans* BL-11 (24 h) (BANERJEE; SHANTHI, 2012) e *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622 (LIMA *et al*., 2015). A neutralização de radicais foi reportada para colágeno (extraído de ossos bovinos) hidrolisado (2 h) com uma protease de *Anoxybacillus caldiproteolyticus* 1A02591 (expressa em *Escherichia coli*) (CHENG *et al*., 2021).

Enzimas microbianas alternativas vêm sendo exploradas na obtenção de hidrolisados antioxidantes de substratos queratinosos. Penas de frango, pelos e cascos suínos, pré-tratados em autoclave, foram hidrolisados com queratinases de *Thermoactinomyces vulgaris* TK1-21 e *Bacillus halodurans* SW-X (72 h), apresentando capacidade de neutralização dos radicais ABTS e DPPH, e redução de Fe^{3+} (KAEWSALUD *et al*., 2023). A eliminação do radical ABTS por hidrolisados de penas (autoclavadas e moídas), produzidos com a protease de *Bacillus* sp. P45 (8 h), foi superior àquela das penas não hidrolisadas (CUNHA *et al*., 2023).

A captura do radical DPPH foi reportada para hidrolisados de penas moídas e autoclavadas, obtidos com uma protease de *Bacillus haynesii* ALW2 (24 h) (EMRAN; ISMAIL; ABDEL-FATTAH, 2020). Uma queratinase de *Bacillus* sp. RCM-SSR-102 foi usada na hidrólise de penas de frango moídas (50 g/L; 16 h). O hidrolisado apresentou 1,72 mg/mL de proteínas solúveis, com capacidade de eliminar radicais DPPH (27,5%) e ABTS (81,3%), bem como de reduzir Fe^{3+} (KSHETRI *et al*., 2020).

Embora exaustivas buscas tenham sido realizadas na literatura científica, poucos são os estudos onde proteases não-comerciais são usadas na obtenção de hidrolisados antioxidantes a partir de fígado, rins e pulmões de animais de açougue. Neste sentido, Yu *et al*. (2017) utilizaram um extrato enzimático do fungo *Monascus purpureus* CCRC 3149 na hidrólise de fígado suíno, e os hidrolisados produzidos exibiram poder redutor, capacidade de quelar Fe^{2+} e eliminar radicais DPPH.

Considerando a escassa literatura, principalmente no que tange aos resultados obtidos (Fig. 3-6), selecionou-se o pulmão bovino como substrato para avaliar as influências do tempo de hidrólise e da relação E/S sobre o potencial antioxidante dos hidrolisados.

4.4 POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE HIDROLISADOS DE PULMÃO BOVINO: EFEITO DO TEMPO DE HIDRÓLISE E DA RELAÇÃO ENZIMA/SUBSTRATO (E/S)

A hidrólise de pulmão bovino foi realizada por 0-480 min (t0-t480) usando três relações E/S. Considerando a relação E/S igual àquela dos experimentos prévios (860 U/g), a concentração inicial de proteínas solúveis do substrato não hidrolisado (t0; 0,88 mg/mL) foi elevada para 1,94 mg/mL em t60, alcançando 3,13-3,20 mg/mL em t360-t480 (Fig. 7). A aplicação de maior concentração inicial de protease (1.400 U/g) acelerou a liberação de proteínas solúveis, que atingiu 2,39 mg/mL em t60, sendo então elevada para 3,19-3,29 mg/mL em t240-t480 (Fig. 7). Estes últimos valores não foram distintos (p > 0,05) daqueles observados em t360-t480 com relação E/S de 860 U/g. Já a menor relação E/S (384 U/g) resultou em taxas mais lentas de hidrólise, sendo que a concentração de proteínas solúveis foi incrementada para 1,44 mg/mL em t60 e 2,90 mg/mL em t480 (Fig. 7).

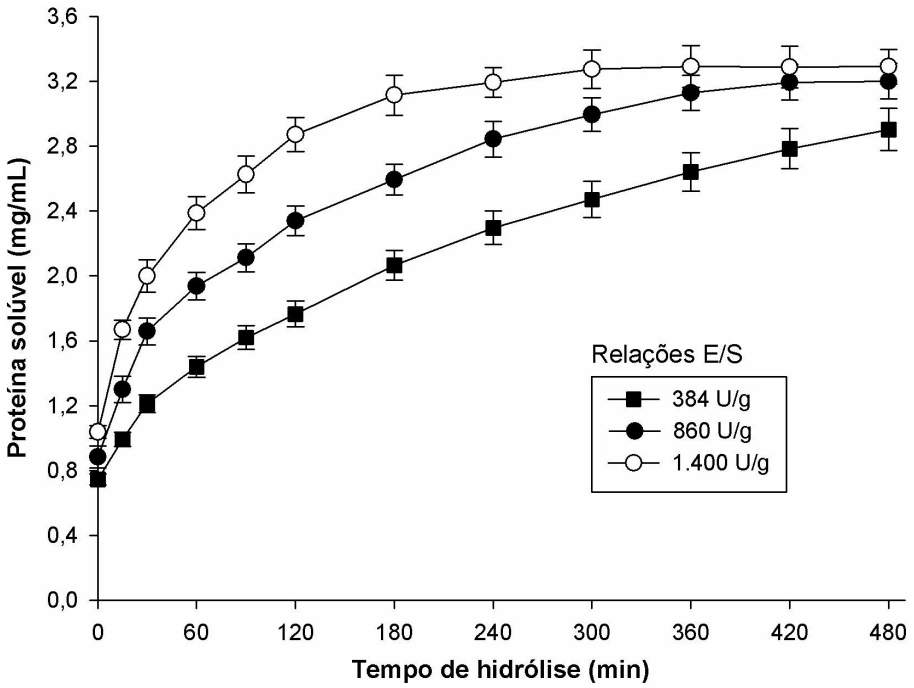

Figura 7 – Concentração de proteínas solúveis em função do tempo de hidrólise de pulmão bovino usando diferentes relações E/S (■, 384 U/g; ●, 860 U/g; ○, 1.400 U/g).

A liberação de proteínas solúveis foi mais rápida no início das hidrólises, diminuindo em função do tempo de processo, dependendo da relação E/S. Tal

comportamento é comumente observado durante a hidrólise enzimática de substratos proteicos (YAN; TAO; QIN, 2016; LIMPISOPHON *et al*., 2020; PRAMUALKIJJA; PIRAK; EUSTON, 2021; CUNHA *et al*., 2023). Taxas mais acentuadas de hidrólise no início do processo são atribuídas à maior disponibilidade de sítios de clivagem no substrato, enquanto que a subsequente redução das taxas pode estar relacionada à diminuição da quantidade de ligações peptídicas hidrolisáveis (SAI-UT *et al*., 2015; CHAN *et al*., 2020; YATHISHA; KARUNASAGAR; MAMATHA, 2021).

Quanto à relação E/S, aumentos na concentração de enzimas proteolíticas também aceleraram a hidrólise (Fig. 7), visto que há maior quantidade de sítios catalíticos disponíveis, o que promove a clivagem mais rápida de ligações peptídicas e a solubilização do substrato (JIANG; XU; SU, 2014; QUEIROZ *et al*., 2017; LIMA *et al*., 2021; CHEN *et al*., 2022). Contudo, elevações na eficiência da hidrólise são comumente observadas até o ponto em que a adição de maior quantidade de enzimas não surte efeito, o que é possível notar quando as duas maiores relações E/S são comparadas (Fig. 7). Isso pode ser atribuído à diminuição (ou à ausência) de sítios de hidrólise nos substratos (CHENG *et al*., 2021; PAGÁN; BENÍTEZ; IBARZ, 2021; PUSPAWATI *et al*., 2021; NGUYEN *et al*., 2022).

Embora o substrato proteico possa conter ligações peptídicas teoricamente suscetíveis à ação enzimática, a estrutura física das proteínas/substratos também é relevante na determinação das taxas de hidrólise, pois afeta o acesso da enzima às ligações hidrolisáveis (BENJAKUL; MORRISSEY, 1997; GUERARD; GUIMAS; BINET, 2002). Ademais, a autólise e/ou desnaturação parcial das enzimas durante o processo, bem como a diminuição da atividade enzimática através de inibição por produtos da hidrólise, também podem ocasionar a redução das taxas hidrolíticas (AISSAOUI; ABIDI; MARZOUKI, 2015; SAI-UT *et al*., 2015; HAMZEH *et al*., 2019).

Os hidrolisados de pulmão bovino foram então avaliados quanto às atividades antioxidantes *in vitro*. A captura do radical DPPH em hidrolisados obtidos usando relação E/S de 860 U/g foi elevada de 4,7% (t0) para 7,6% em t90 e para 10,1-10,4% em t240-480 (Fig. 8). Embora tenha sido observada tendência de queda na eliminação do radical DPPH em t360-t480 quando comparada à atividade em t240-t300, as diferenças não foram significativas ($p > 0,05$).

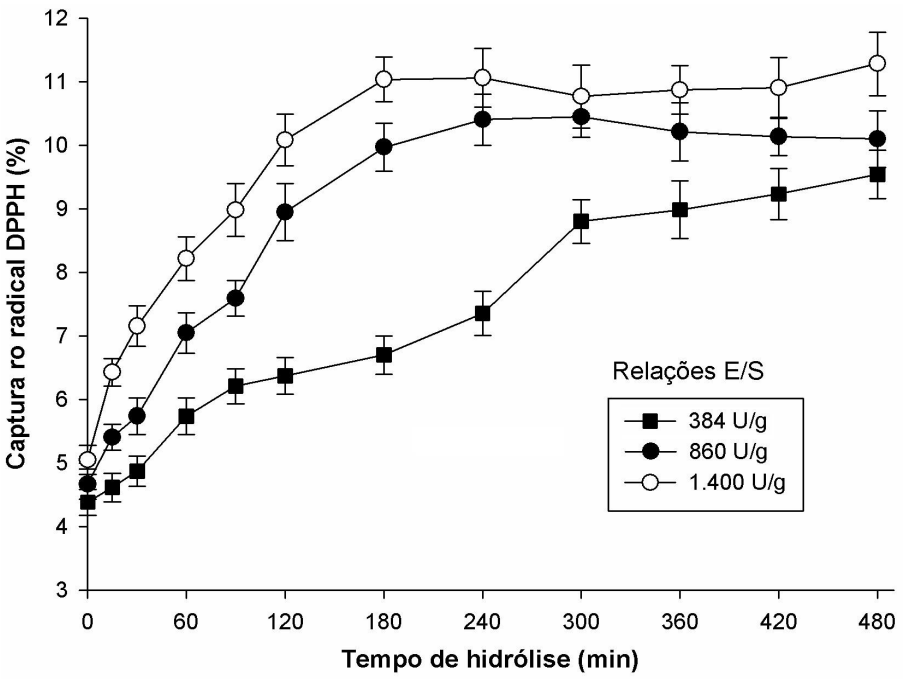

Figura 8 – Captura do radical DPPH por hidrolisados de pulmão bovino em função do tempo de hidrólise usando diferentes relações E/S (■, 384 U/g; ●, 860 U/g; ○, 1.400 U/g).

A maior relação E/S (1.400 U/g) ocasionou incremento mais acelerado desta bioatividade, resultando nos valores mais elevados entre todas as relações E/S no intervalo t15-t180 ($p < 0,05$). As porcentagens de captura atingiram 10,8-11,2% em t180-t480. Entre t240 e t420, as diferenças não foram significativas em comparação com a E/S de 860 U/g ($p > 0,05$); contudo, significância ($p < 0,05$) foi verificada em t480 (Fig. 8).

A captura do radical DPPH em hidrolisados obtidos com a menor relação E/S (384 U/g) foi inferior àquela detectada em hidrolisados produzidos com maiores relações E/S, com exceção da atividade em t480, que foi similar ($p > 0,05$) àquela determinada em hidrolisados t480 produzidos com a relação E/S de 860 U/g (Fig. 8).

A eliminação do radical ABTS por hidrolisados obtidos com relação E/S de 860 U/g foi incrementada de 15,8% (t0) para 38,9%, 58,3%, e 68,1-70,5%, em t60, t180 e t360-t480, respectivamente (Fig. 9). Os hidrolisados produzidos com a maior relação E/S (1.400 U/g) apresentaram atividade superior àqueles obtidos com as demais relações E/S considerando t15-t300, indicando liberação mais rápida de peptídeos antioxidantes. Os valores máximos (71,1-72,2%, t300-t480), no entanto,

não foram mais elevados do que aqueles exibidos por hidrolisados obtidos com a relação E/S de 860 U/g em t360-t480 (Fig. 9).

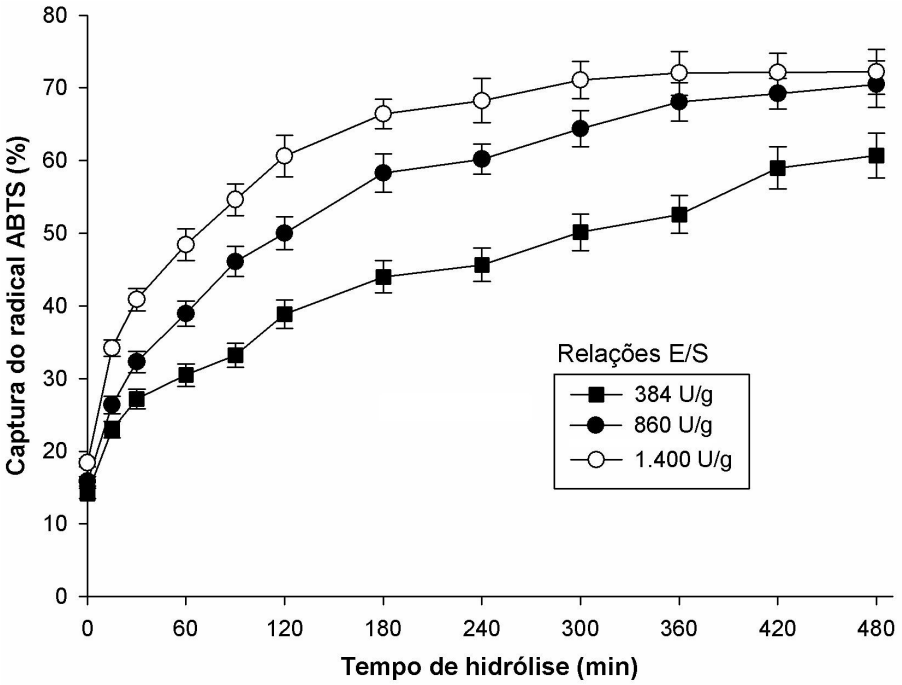

Figura 9 – Captura do radical ABTS por hidrolisados de pulmão bovino em função do tempo de hidrólise usando diferentes relações E/S (■, 384 U/g; ●, 860 U/g; ○, 1.400 U/g).

Aumentos na neutralização do radical ABTS também ocorreram ao longo do tempo em hidrolisados obtidos com a menor relação E/S (384 U/g), alcançando 59,0-60,7% em t420-t480. Independentemente do tempo de hidrólise, estas bioatividades foram inferiores ($p < 0,05$) àquelas observadas em hidrolisados produzidos com maiores relações E/S (Fig. 9).

A hidrólise de pulmão bovino usando a relação E/S intermediária (860 U/g) resultou em hidrolisados com capacidade de quelação de Fe^{2+} igual a 56,7% (t60), 64,0% (t120) e 70,8-73,1% (t360-t480), que representam valores superiores àqueles do substrato não hidrolisado (t0; 47,6%) (Fig. 10). Hidrolisados produzidos com a maior relação E/S (1.400 U/g) exibiram capacidade superior de quelação em t15-t180, quando comparados aos hidrolisados obtidos nos mesmos períodos com menores relações E/S ($p < 0,05$). No entanto, a atividade quelante diminuiu com o aumento do tempo de hidrólise (Fig. 10).

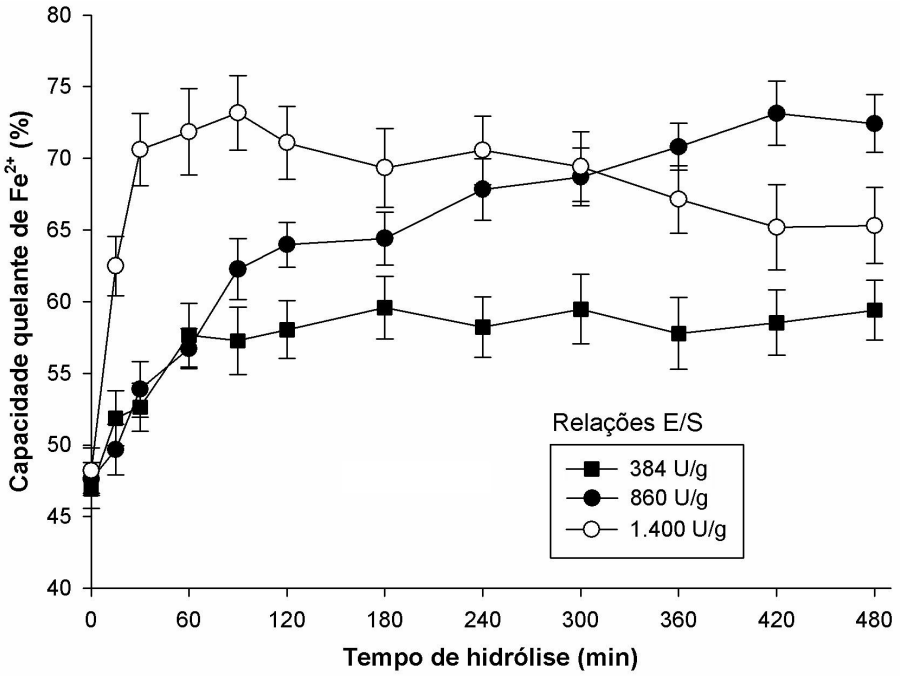

Figura 10 – Capacidade de quelação de Fe^{2+} por hidrolisados de pulmão bovino em função do tempo de hidrólise usando diferentes relações E/S (■, 384 U/g; ●, 860 U/g; ○, 1.400 U/g).

As maiores porcentagens de quelação observadas com a relação E/S de 1.400 U/g (69,4-73,2%, t30-t300) foram similares ($p > 0,05$) àquelas mensuradas nos hidrolisados t360-t480 produzidos com relação E/S de 860 U/g (Fig. 10). A capacidade de quelar Fe^{2+} dos hidrolisados obtidos com a menor relação E/S (384 U/g) foi similar àquela dos hidrolisados produzidos com relação E/S intermediária (860 U/g) no intervalo t15-t60; contudo, as capacidades de quelação foram inferiores após este período (Fig. 10).

Quanto ao poder redutor, os valores iniciais de 0,018 Abs700 (t0) foram elevados para 0,076 Abs700 (t60) e 0,119-0,125 Abs700 (t360-t480), com a utilização da relação E/S de 860 U/g (intermediária) (Fig. 11). Comparativamente, valores superiores foram detectados, entre t30 e t360, nos hidrolisados produzidos com a maior relação E/S. O máximo poder redutor (0,128-0,132 Abs700; t300-t480) foi similar ($p > 0,05$) àquele mensurado em hidrolisados obtidos com a relação E/S intermediária em t420-t480 (0,124-0,125 Abs700) (Fig. 11). Neste sentido, embora a hidrólise também tenha afetado positivamente o poder redutor com a aplicação da menor relação E/S (384 U/g), os valores máximos observados foram de 0,090-0,094 Abs700 em t420-t480 (Fig. 11).

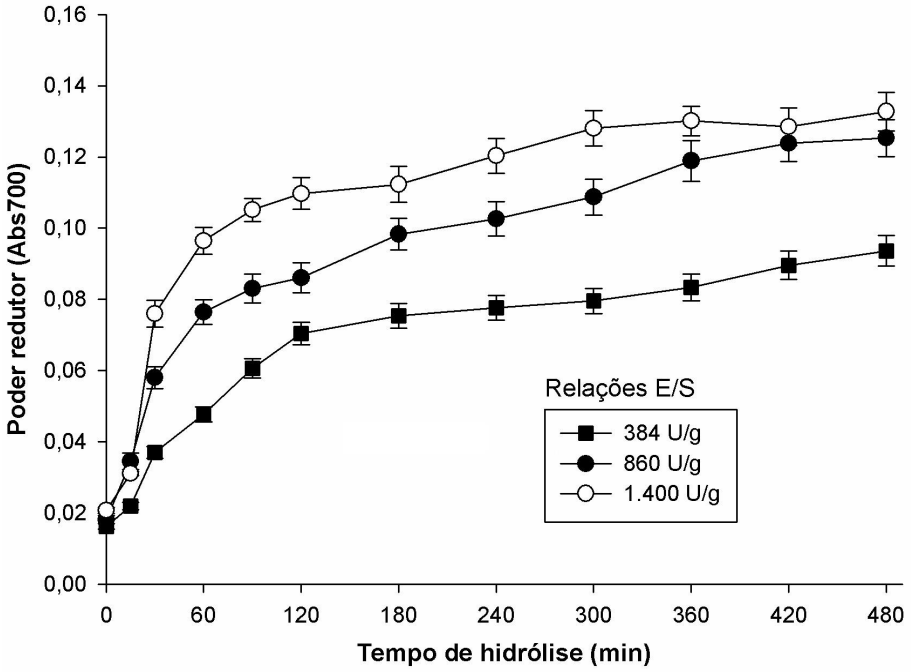

Figura 11 – Poder redutor de hidrolisados de pulmão bovino obtidos em função do tempo de hidrólise usando diferentes relações E/S (■, 384 U/g; ●, 860 U/g; ○, 1.400 U/g).

No intervalo de tempo avaliado (0-480 min), as capacidades antioxidantes foram incrementadas até certo período de hidrólise, mantendo-se relativamente estáveis em tempos subsequentes na maior parte dos hidrolisados produzidos com diferentes relações E/S (Fig. 8-11). Tal comportamento em função do tempo de hidrólise é também observado em outros estudos, indicando certa estabilidade dos peptídeos bioativos liberados frente a novas clivagens enzimáticas (CHOU *et al*., 2014; XU *et al*., 2017; DONG *et al*., 2021; GUI *et al*., 2022).

Entretanto, a exceção é feita à capacidade quelante de Fe^{2+} dos hidrolisados produzidos com relação E/S de 1.400 U/g, onde detectou-se diminuição desta atividade após t90 ($p < 0,05$) (Fig. 10). Dependendo do substrato e da enzima empregados, bem como do ensaio usado para detecção da capacidade antioxidante, a bioatividade avaliada pode apresentar flutuações ao longo da hidrólise e, eventualmente, decair caso o processo transcorra por períodos mais extensos (CHENG *et al*., 2016; PRAMUALKIJJA; PIRAK; EUSTON, 2021; SUN *et al*., 2021; NGUYEN *et al*., 2022). Neste sentido, Saeed *et al*. (2020) observaram que a captura

de radicais DPPH e ABTS por hidrolisados de fígado e de rins, produzidos com papaína, foi elevada até 6 h de hidrólise, reduzindo após 8 h.

Quanto à relação E/S, a menor concentração de enzima (384 U/g) resultou em atividades antioxidantes inferiores (Fig. 8-11), com exceção da quelação de Fe^{2+} em t15-t60 (Fig. 10), e da eliminação do radical DPPH em t480 (Fig. 8), que se apresentaram similares àquelas detectadas nos mesmos períodos com o uso da relação E/S de 860 U/g. A maior relação E/S (1.400 U/g), por sua vez, ocasionou a elevação mais rápida das atividades antioxidantes. Apesar disso, as máximas bioatividades foram similares entre as duas maiores relações E/S, apenas sendo observadas diferenças no tempo de hidrólise necessário para atingi-las.

De fato, a maior concentração inicial de proteases pode acelerar a liberação de peptídeos antioxidantes (JEAMPAKDEE *et al*., 2020; ATMA; FITRIANI; MUSTOPA, 2021; LAOSAM *et al*., 2021). No entanto, após a bioatividade máxima ser atingida em certa relação E/S, o uso de maior concentração de proteases não necessariamente resulta em elevação do potencial antioxidante, podendo inclusive reduzi-lo (CHOU *et al*., 2014; PUSPAWATI *et al*., 2021; CHEN *et al*., 2022; MATTOHTI *et al*., 2023).

Tais observações tornam-se mais complexas em virtude dos diferentes comportamentos das respostas antioxidantes mensuradas por meio de ensaios distintos. Zheng *et al*. (2018), por exemplo, reportaram que o aumento da relação E/S diminuiu a capacidade de captura do radical DPPH e elevou o poder redutor de hidrolisados de células sanguíneas de frango produzidos com papaína e Flavourzyme.jk

A diminuição das atividades antioxidantes, como aquela observada para a quelação de Fe^{2+} na maior relação E/S (1.400 U/g) após t90 (Fig. 10), pode ser compreendida considerando que a hidrólise de proteínas é um processo dinâmico (BRANDELLI; DAROIT, *no prelo*). Assim, ao mesmo tempo em que a hidrólise é essencial à liberação de peptídeos bioativos a partir do substrato, estes peptídeos podem também estar sujeitos à hidrólise. Portanto, em processos hidrolíticos mais intensos, caracterizados pelo prolongamento do tempo de hidrólise e/ou pela aplicação de relações E/S mais elevadas, a clivagem de peptídeos antioxidantes pode resultar na perda de sua atividade (GÓMEZ *et al*., 2019; YANG *et al*., 2020; ZHANG; DONG; DAI, 2021; NGUYEN *et al*., 2022).

5 CONCLUSÃO

A protease bruta de *Bacillus* sp. CL18 foi capaz de hidrolisar diversos subprodutos da indústria da carne/pescado, e os hidrolisados obtidos exibiram potencial antioxidante superior àquele dos subprodutos não submetidos à hidrólise. A capacidade antioxidante foi demonstrada, *in vitro*, pela capacidade de transferência de elétrons e quelação de Fe^{2+}.

De nosso conhecimento, o uso de uma protease microbiana não-comercial na produção de hidrolisados antioxidantes a partir de pulmões e rins de animais de açougue é apresentada pela primeira vez.

Pulmões bovinos apresentaram-se como os substratos mais promissores para a obtenção de hidrolisados antioxidantes. Neste sentido, as investigações envolvendo o tempo de hidrólise e a relação E/S indicaram que ambas as variáveis exerceram influência considerável sobre as atividades antioxidantes dos hidrolisados.

Considerando a produção de hidrolisados antioxidantes de pulmões bovinos, sugere-se que as hidrólises possam ocorrer por 240 min utilizando relação E/S de 1.400 U/g, ou por 360 min utilizando relação E/S de 860 U/g. Considerando aspectos econômicos, indica-se a segunda opção como mais viável, visto que, embora haja aumento de 50% no tempo de reação, há diminuição de 38% no uso de biocatalisador, que usualmente representa fração importante do custo dos processos hidrolíticos.

Acredita-se que estudos subsequentes possam ser dedicados à identificação dos peptídeos antioxidantes contidos nos hidrolisados de pulmões bovinos, bem como novas pesquisas podem ser realizadas visando melhor explorar o processo de hidrólise e o potencial antioxidante dos outros onze subprodutos analisados.

REFERÊNCIAS

ABDELHEDI, O. *et al*. Combined biocatalytic conversion of smooth hound viscera: Protein hydrolysates elaboration and assessment of their antioxidant, anti-ACE and antibacterial activities. **Food Research International**, v. 86, p. 9–23, 2006.

AGRAWAL, H.; JOSHI, R.; GUPTA, M. Isolation, purification and characterization of antioxidative peptide of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) protein hydrolysate. **Food Chemistry**, v. 204, p. 365–372, 2016.

AGUILAR, J. G. S.; SATO, H. H. Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 103, p. 253–262, 2018.

AGUILAR, J. G. S.; SOUZA, A. K. S.; CASTRO, R. J. S. Enzymatic hydrolysis of chicken viscera to obtain added-value protein hydrolysates with antioxidant and antihypertensive properties. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 26, p. 717–725, 2020.

AISSAOUI, N.; ABIDI, F.; MARZOUKI, M. N. ACE inhibitory and antioxidant activities of red scorpionfish (*Scorpaena notata*) protein hydrolysates. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 7092–7102, 2015.

AKBARIAN, M. *et al*. Bioactive peptides: synthesis, sources, applications, and proposed mechanisms of action. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, artigo 1445, 2022.

ALAO, B. O. *et al*. The potential of animal by-products in food systems: production, prospects and challenges. **Sustainability**, v. 9, artigo 1089, 2017.

ARYA, P. S. *et al*. Understanding the basis of occurrence, biosynthesis, and implications of thermostable alkaline proteases. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 193, p. 4113–4150, 2021.

ATMA, Y.; FITRIANI, D.; MUSTOPA, A. Z. Radical-scavenging activity of fish gelatin hydrolysates from bone of Pangasius catfish (*Pangasius sutchi*) by microbial proteases hydrolysis. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 11, p. 7903–7911, 2021.

AZADIAN, M.; MOOSAVI-NASAB, M.; ABEDI, E. Comparison of functional properties and SDS-PAGE patterns between fish protein isolate and surimi produced from silver carp. **European Food Research and Technology**, v. 235, p. 83–90, 2012.

BANERJEE, P.; SHANTHI, C. Isolation of novel bioactive regions from bovine Achilles tendon collagen having angiotensin I-converting enzyme-inhibitory properties. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 2335–2346, 2012.

BANERJEE, P.; SUSEELA, G.; SHANTHI, C. Isolation and identification of cryptic bioactive regions in bovine Achilles tendon collagen. **The Protein Journal**, v. 31, p. 374–386, 2012.

BARAKAT, N. A. M. *et al*. Extraction of pure natural hydroxyapatite from the bovine bones bio waste by three different methods. **Journal of Materials Processing Technology**, v. 209, p. 3408–3415, 2009.

BECHAUX, J. *et al*. Workflow towards the generation of bioactive hydrolysates from porcine products by combining *in silico* and *in vitro* approaches. **Food Research International**, v. 132, artigo 109123, 2020.

BEN KHALED, H. *et al*. Composition, functional properties and *in vitro* antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from sardinelle (*Sardinella aurita*) muscle. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, p. 622–633, 2014.

BENJAKUL, S.; MORRISSEY, M. T. Protein Hydrolysates from Pacific white solid wastes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 3423–3430, 1997.

BERNARDO, B. S.; KOPPLIN, B. W.; DAROIT, D. J. Bioconversion of fish scales and feather wastes by *Bacillus* sp. CL18 to obtain protease and bioactive hydrolysates. **Waste and Biomass Valorization**, v. 14, p. 1045–1056, 2023.

BHANDARI, D. *et al*. A review on bioactive peptides: physiological functions, bioavailability and safety. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 26, p. 139–150, 2020.
BIEL, W.; CZERNIAWSKA-PIĄTKOWSKA, E.; KOWALCZYK, A. Offal chemical composition from veal, beef, and lamb maintained in organic production systems. **Animals**, v. 9, artigo 489, 2019.

BISWAL, B. *et al*. Extraction of silk fibroin with several sericin removal processes and its importance in tissue engineering: A review. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 30, p. 2222–2253, 2022.

BORRAJO, P. *et al*. Antioxidant and antimicrobial activity of peptides extracted from meat by-products: a review. **Food Analytical Methods**, v. 12, p. 2401–2415, 2019.

BOUGATEF, A. *et al*. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. **Food Chemistry**, v. 118, p. 559–565, 2010.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRANDELLI, A.; DAROIT, D.J. Unconventional microbial proteases as promising tools for the production of bioactive protein hydrolysates. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, *no prelo*. https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2145262

BRAVO, F. I. *et al*. Valorization of chicken slaughterhouse byproducts to obtain antihypertensive peptides. **Nutrients**, v. 15, artigo 457, 2023.

CAMARGO, T. R. *et al*. Biological activities of the protein hydrolysate obtained from two fishes common in the fisheries bycatch. **Food Chemistry**, v. 342, artigo 128361, 2021.

CHAKKA, A. K. *et al*. In-vitro antioxidant and antibacterial properties of fermentatively and enzymatically prepared chicken liver protein hydrolysates. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 8059–8067, 2015.

CHAN, P.-T. *et al*. ACE-inhibitory and antioxidant activities of hydrolysates from the by-products of hybrid grouper (*Epinephelus lanceolatus* × *Epinephelus fuscoguttatus*). **Sains Malaysiana**, v. 49, p. 261–270, 2020.

CHAN, P.-T. *et al*. Novel peptide sequences with ace-inhibitory and antioxidant activities derived from the heads and bones of hybrid groupers (*Epinephelus lanceolatus* × *Epinephelus fuscoguttatus*). **Foods**, v. 11, artigo 3991, 2022.

CHANG, C. Y.; WU, K. C.; CHIANG, S. H. Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1537–1543, 2007.

CHEN, X.-L. *et al*. Preparation and functional evaluation of collagen oligopeptide-rich hydrolysate from fish skin with the serine collagenolytic protease from *Pseudoalteromonas* sp. SM9913. **Scientific Reports**, v. 7, artigo 15716, 2017.

CHEN, S. *et al*. Bioactive peptides derived from crimson snapper and *in vivo* anti-aging effects on fat diet-induced high fat *Drosophila melanogaster*. **Food & Function**, v. 11, p. 524–533, 2020.

CHEN, B. *et al*. Effects of collagen hydrolysate from large hybrid sturgeon on mitigating ultraviolet B-induced photodamage. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, artigo 908033, 2022.

CHENG, F.-Y. *et al*. The *in vitro* antioxidant properties of alcalase hydrolysate prepared from silkie fowl (*Gallus gallus*) blood protein. **Animal Science Journal**, v. 87, p. 921–928, 2016.

CHENG, J. H. *et al*. Potential of thermolysin-like protease A69 in preparation of bovine collagen peptides with moisture-retention ability and antioxidative activity. **Marine Drugs**, v. 19, artigo 676, 2021.

CHOU, C.-H. *et al*. Antioxidant activities of chicken liver hydrolysates by pepsin treatment. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, p. 1654–1662, 2014.

CONTESINI, F. J.; MELO, R. R.; SATO, H. H. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, n. 3, p. 321–334, 2018.

CUNHA, I. C. *et al*. Feather meal as a source of peptides with antioxidant activity from enzymatic hydrolysis. **Waste and Biomass Valorization**, v. 14, p. 421–430, 2023.

CZELEJ, M. *et al*. Protein hydrolysates derived from animals and plants – a review of production methods and antioxidant activity. **Foods**, v. 11, artigo 1953, 2022.

DAMGAARD, T. D. *et al*. Antioxidant capacity of hydrolyzed porcine tissues. **Food Science & Nutrition**, v. 2, p. 282–288, 2014.

DAMGAARD, T.; LAMETSCH, R.; OTTE, J. Antioxidant capacity of hydrolyzed animal by-products and relation to amino acid composition and peptide size distribution. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 6511–6519, 2015.

DAROIT, D. J.; BRANDELLI, A. *In vivo* bioactivities of food protein-derived peptides – a current review. **Current Opinion in Food Science**, v. 39, p. 120–129, 2021.

DELGADO-GARCÍA, M. *et al*. Bioprospection of proteases from *Halobacillus andaensis* for bioactive peptide production from fish muscle protein. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 39, p. 52–60, 2019.

DI BERNARDINI, R. *et al*. Isolation, purification and characterization of antioxidant peptidic fractions from a bovine liver sarcoplasmic protein thermolysin hydrolysate. **Peptides**, v. 32, p. 388–400, 2011.

DOAN, C. T. *et al*. Utilization of seafood processing by-products for production of proteases by *Paenibacillus* sp. TKU052 and their application in biopeptides' preparation. **Marine Drugs**, v. 18, artigo 574, 2020.

DONG, Y. *et al*. Steam explosion-assisted extraction of protein from fish backbones and effect of enzymatic hydrolysis on the extracts. **Foods**, v. 10, artigo 1942, 2021.
DU, Z.; LI, Y. Review and perspective on bioactive peptides: A roadmap for research, development, and future opportunities. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 9, artigo 100353, 2022.

EMRAN, M. A.; ISMAIL, S. A.; ABDEL-FATTAH, A. M. Valorization of feather via the microbial production of multi-applicable keratinolytic enzyme. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 27, artigo 101674, 2020.

ETEMADIAN, Y., *et al*. Development of animal/plant-based protein hydrolysate and its application in food, feed and nutraceutical industries: State of the art. **Journal of Cleaner Production**, v. 278, artigo 123219, 2021.

FAN, H. *et al*. Effect of different drying methods combined with fermentation and enzymolysis on nutritional composition and flavor of chicken bone powder. **Drying Technology**, v. 39, p. 1240–1250, 2021.

GHANBARINIA, S. *et al*. The effect of hydrolyzed sesame meal protein on the quality and shelf life of hamburgers during refrigerated storage. **Animal Science Journal**, v. 93, artigo e13729, 2022.

GIMENES, N. C.; SILVEIRA, E.; TAMBOURGI, E. B. An overview of proteases: production, downstream processes and industrial applications. **Separation and Purification Reviews**, v. 50, n. 3, p. 223–243, 2021.

GÓMEZ, L. J. *et al*. In-vitro antioxidant capacity and cytoprotective/cytotoxic effects upon Caco-2 cells of red tilapia (*Oreochromis* spp.) viscera hydrolysates. **Food Research International**, v. 120, p. 52–61, 2019.

GÖRGÜÇ, A.; GENÇDAĞ, E.; YILMAZ, F. M. Bioactive peptides derived from plant origin by-products: Biological activities and techno-functional utilizations in food developments – A review. **Food Research International**, v. 136, artigo 109504, 2020.

GREYLING, N.; BORDOLOI, A.; GOOSEN, N. L. Optimising enzymatic conditions of monkfish (*Lophius vomerinus*) leads to hydrolysis towards potential waste biomass valorisation. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 11, p. 2711–2722, 2021.
GUERARD, F.; GUIMAS, L.; BINET, A. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 19–20, p. 489–498, 2002.

GUI, M. *et al*. Bioactive peptides identified from enzymatic hydrolysates of sturgeon skin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 102, p. 1948–1957, 2022.

GULCIN, I.; AL WASL, S. H. Metal ions, metal chelators and metal chelating assay as antioxidant methods. **Processes**, v. 10, artigo 132, 2022.

HALLDORSDOTTIR, S. M. *et al*. High quality fish protein hydrolysates prepared from by-product material with *Fucus vesiculosus* extract. **Journal of Functional Foods**, v. 9, p. 10–17, 2014.

HAMMAMI, A. *et al*. Low-cost culture medium for the production of proteases by *Bacillus mojavensis* SA and their potential use for the preparation of antioxidant protein hydrolysate from meat sausage by-products. **Annals of Microbiology**, v. 68, p. 473–484, 2018.

HAMZEH, A. *et al*. Cellular and chemical antioxidant activities of chicken blood hydrolysates as affected by *in vitro* gastrointestinal digestion. **Poultry Science**, v. 98, p. 6138–6148, 2019.

HAN, K.-H., *et al*. Porcine splenic hydrolysate has antioxidant activity in vivo and in vitro. **Korean Journal for Food Sciences of Animal Resources**, v. 34, p. 325–332, 2014.

HASAN, M. J.; HAQUE, P.; RAHMAN, M. M. Protease enzyme based cleaner leather processing: A review. **Journal of Cleaner Production**, v. 365, artigo 132826, 2022.

HASSAN, M. A. *et al*. Antioxidant properties and instrumental quality characteristics of spray dried *Pangasius* visceral protein hydrolysate prepared by chemical and

enzymatic methods. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 8875–8884, 2019.

HENRY, S. G. M. *et al*. Carcass characteristics and nutritional composition of some edible chicken by-products. **Egyptian Journal of Food Science**, v. 47, p. 81–90, 2019.
HONG, G.-P.; MIN, S.-G.; JO, Y.-J. Anti-oxidative and anti-aging activities of porcine by-product collagen hydrolysates produced by commercial proteases: effect of hydrolysis and ultrafiltration. **Molecules**, v. 24, artigo 1104, 2019.

HONG, C. *et al*. Effects of dual-frequency slit ultrasound on the enzymolysis of high-concentration hydrolyzed feather meal: Biological activities and structural characteristics of hydrolysates. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 89, artigo 106135, 2022.

HORN, S. J.; ASPMO, S. I.; EIJSINK, V. G. H. Evaluation of different cod viscera fractions and their seasonal variation used in a growth medium for lactic acid bacteria. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1328–1334, 2007.

JAMDAR, S. N.; HARIKUMAR, P. Radiation decontamination of poultry viscera. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 77, p. 467–472, 2008.

JEAMPAKDEE, P. *et al*. The apoptotic and free radical-scavenging abilities of the protein hydrolysate obtained from chicken feather meal. **Poultry Science**, v. 99, p. 1693–1704, 2020.

JEMIL, I. *et al*. Novel bioactive peptides from enzymatic hydrolysate of sardinelle (*Sardinella aurita*) muscle proteins hydrolysed by *Bacillus subtilis* A26 proteases. **Food Research International**, v. 100, p. 121–133, 2017.

JIANG, Z.; XU, Y.; SU, Y. Preparation process of active enzymolysis polypeptides from seahorse bone meal. **Food Science & Nutrition**, v. 2, p. 490–499, 2014.

KAEWSALUD, T. *et al*. Hydrothermal-enzymatic process for the bio-valorization of keratin wastes by thermostable keratinase from *Thermoactinomyces vulgaris* TK1-21. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 98, p. 1203–1214, 2023.

KANDYLIARI, A. *et al*. Nutrient composition and fatty acid and protein profiles of selected fish by-products. **Foods**, v. 9, artigo 190, 2020.

KOCK, S. W.; VAN RYSSEN, J. B. J.; DAVIES, D. G. Chemical composition of carcass sawdust residue as a predictor of the chemical composition of sheep carcasses. **South African Journal of Animal Science**, v. 25, p. 50–52, 1995.

KSHETRI, P. *et al*. Valorization of chicken feather waste into bioactive keratin hydrolysate by a newly purified keratinase from *Bacillus* sp. RCM-SSR-102. **Journal of Environmental Management**, v. 273, artigo 111195, 2020.

LAFARGA, T.; HAYES, M. Bioactive peptides from meat muscle and by-products: generation, functionality and application as functional ingredients. **Meat Science**, v. 98, p. 227–239, 2014.

LAFARGA, T.; ÁLVAREZ, C.; HAYES, M. Bioactive peptides derived from bovine and porcine co-products: A review. **Journal of Food Biochemistry**, v. 41, artigo e12418, 2017.

LAOSAM, P. *et al*. Porcine placenta hydrolysate as an alternate functional food ingredient: *In vitro* antioxidant and antibacterial assessments. **PLoS ONE**, v. 16, artigo e0258445, 2021.

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.

LEE, D. H. *et al*. Proteases production and chitin preparation from the liquid fermentation of chitinous fishery by-products by *Paenibacillus elgii*. **Marine Drugs**, v. 19, artigo 477, 2021.

LENG, W. *et al*. Systematic functional analysis and potential application of a serine protease from cold-adapted *Planococcus* bacterium. **Food Science and Human Wellness**, v. 12, p. 1751–1761, 2023.

LERMEN, A. M.; CLERICI, N. J.; DAROIT, D. J. Biochemical properties of a partially purified protease from *Bacillus* sp. CL18 and its use to obtain bioactive soy protein hydrolysates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 192, p. 643–664, 2020.

LIMA, C. A. *et al*. Antimicrobial and radical scavenging properties of bovine collagen hydrolysates produced by *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622 collagenase. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 4459–4466, 2015.

LIMA, D. A. S. *et al*. Technological properties of protein hydrolysate from the cutting byproduct of serra spanish mackerel (*Scomberomorus brasiliensis*). **Journal of Food Science and Technology**, v. 58, p. 2952–2962, 2021.

LIMA, D. A. S. *et al*. The cutting by-product of fish filleting on the band saw machine: nutritional quality and technological potential. **Waste and Biomass Valorization**, v. 13, p. 4575–4584, 2022.

LIMPISOPHON, K. *et al*. Optimization of hydrolysis conditions for production of gelatin hydrolysates from shark skin byproduct and evaluation of their antioxidant activities. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 29, p. 736–749, 2020.

LIU, R. *et al*. A review of antioxidant peptides derived from meat muscle and by-products. **Antioxidants**, v. 5, artigo 32, 2016.

LIU, D. *et al*. Purification, characterization, and application for preparation of antioxidant peptides of extracellular protease from *Pseudoalteromonas* sp. H2. **Molecules**, v. 24, artigo 3373, 2019.

LONDOÑO-ZAPATA, L. *et al*. Valorization of the by-products of poultry industry (bones) by enzymatic hydrolysis and glycation to obtain antioxidants compounds. **Waste and Biomass Valorization**, v. 13, p. 4469–4480, 2022.

LÓPEZ-PEDROUSO, M. *et al*. Antioxidant activity and peptidomic analysis of porcine liver hydrolysates using alcalase, bromelain, flavourzyme and papain enzymes. **Food Research International**, v. 137, artigo 109389, 2020.

LÓPEZ-PEDROUSO, M. *et al*. In search of antioxidant peptides from porcine liver hydrolysates using analytical and peptidomic approach. **Antioxidants**, v. 11, artigo 27, 2022.

LORENZO, J. M. *et al*. Bioactive peptides as natural antioxidants in food products – A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 79, p. 136-147, 2018.

LOWRY, O. H. *et al*. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193. p. 265-275, 1951.

LU, H.; LUO, Y.; FENG, L. Effects of hydrolysates from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) scales on rancidity stability and gel properties of fish products. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, p. 2178–2188, 2014.

LYNCH, S. A. *et al*. Opportunities and perspectives for utilisation of co-products in the meat industry. **Meat Science**, v. 144, p. 62–73, 2018a.

LYNCH, S. A. *et al*. Optimization of protein recovery from bovine lung by pH shift process using response surface methodology. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, p. 1951–1960, 2018b.

MALCORPS, W. *et al*. Nutritional characterisation of European aquaculture processing by-products to facilitate strategic utilization. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 5, artigo 720595, 2021.

MANNI, L. *et al*. Extraction and characterization of chitin, chitosan, and protein hydrolysates prepared from shrimp waste by treatment with crude protease from *Bacillus cereus* SV1. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 345–357, 2010.

MARTÍ-QUIJAL, F. J. *et al*. Impact of fermentation on the recovery of antioxidant bioactive compounds from sea bass byproducts. **Antioxidants**, v. 9, artigo 239, 2020.

MARTINEZ, F. G. *et al*. Enzymatic hydrolysis as a valorization strategy of bovine lungs: optimization of process variables and study of antioxidant capacity. **JSFA Reports**, v. 3, p. 161–169, 2023.

MARTÍNEZ-ALVAREZ, O.; CHAMORRO, S.; BRENES, A. Protein hydrolysates from animal processing by-products as a source of bioactive molecules with interest in animal feeding: A review. **Food Research International**, v. 73, p. 204–212, 2015.

MATKAWALA, F. *et al*. Microbial alkaline serine proteases: Production, properties and applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, artigo 63, 2021.

MATTOHTI, W. *et al*. Isolation and structural characterization of antioxidant peptides from horse bone marrow protein hydrolysates. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 17, p. 732–750, 2023.

MAYSONNAVE, G. S. *et al*. Physicochemical characterization of by-products from beef cattle slaughter and economic feasibility of commercialization. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 42, artigo e46545, 2020.

MENEZES, C. L. A. *et al*. Industrial sustainability of microbial keratinases: production and potential applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, artigo 86, 2021.

MESHGINFAR, N. *et al*. Study of antioxidant activity of sheep visceral protein hydrolysate: Optimization using response surface methodology. **ARYA Atherosclerosis**, v. 10, p. 179–184, 2014.

MILLAN, G. C. L. *et al*. Biological activities of whey protein hydrolysate produced by protease from the Antarctic bacterium *Lysobacter* sp. A03. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 43, artigo 102415, 2022.

MORA, L.; REIG, M.; TOLDRÁ, F. Bioactive peptides generated from meat industry by-products. **Food Research International**, v. 65, p. 344–349, 2014.

MULLEN, A. M.; ÁLVAREZ, C. Offal: types and composition. *In*: CABALLERO, B.; FINGLAS, P. M.; TOLDRÁ, F. **Encyclopedia of Food and Health**. Oxford: Academic Press, 2016. p. 152–157.

MUNTEANU, I. G.; APETREI, C. Analytical methods used in determining antioxidant activity: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, artigo 3380, 2021.

NASRI, R. *et al*. Antioxidant and free radical-scavenging activities of goby (*Zosterisessor ophiocephalus*) muscle protein hydrolysates obtained by enzymatic treatment. **Food Biotechnology**, v. 26, p. 266–279, 2012.

NAVEED, M. *et al*. Protease – A versatile and ecofriendly biocatalyst with multi-industrial applications: an updated review. **Catalysis Letters**, v. 151, p. 307–323, 2021.

NGUYEN, H. T. *et al*. Protein characteristics and bioactivity of fish protein hydrolysates from Tra catfish (*Pangasius hypophthalmus*) side stream isolates. **Foods**, v. 11, artigo 4102, 2022.

NIE, X. *et al*. Antioxidant activities of chicken bone peptide fractions and their Maillard reaction products: Effects of different molecular weight distributions. **International Journal of Food Properties**, v. 20 (sup1), p. S457–S466, 2017.

NWACHUKWU, I. D.; ALUKO, R. E. Structural and functional properties of food protein-derived antioxidant peptides. **Journal of Food Biochemistry**, v. 43, artigo e12761, 2019.

DE OLIVEIRA, C. T. *et al*. Prospecting soil bacteria from subtropical Brazil for hydrolases production. **Biologia**, v. 72, n. 2, p. 130-139, 2017.

O'SULLIVAN, S. M. *et al*. Bioactivity of bovine lung hydrolysates prepared using papain, pepsin, and Alcalase. **Journal of Food Biochemistry**, v. 41, artigo e12406, 2017.

PAGÁN, J.; BENÍTEZ, R.; IBARZ, A. Effect of enzymatic hydrolyzed protein from pig bones on some biological and functional properties. **Journal of Food Science and Technology**, v. 58, p. 4626–4635, 2021.

PATEIRO, M. *et al*. Nutritional profiling and the value of processing by-products from gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **Marine Drugs**, v. 18, artigo 101, 2020.

PEZESHK, S. *et al*. Fractionation of protein hydrolysates of fish waste using membrane ultrafiltration: investigation of antibacterial and antioxidant activities. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 11, p. 1015–1022, 2019.

PHADKE, G. G. *et al*. Exploiting of secondary raw materials from fish processing industry as a source of bioactive peptide-rich protein hydrolysates. **Marine Drugs**, v. 19, artigo 480, 2021.

POWER, O.;JAKEMAN, P.; FITZGERALD, R. J. Antioxidative peptides: enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides. **Amino Acids**, v. 44, p. 797–820, 2013.
PRAMUALKIJJA, T.; PIRAK, T.; EUSTON, S. R. Valorization of chicken slaughterhouse by-products: Production and properties of chicken trachea hydrolysates using commercial proteases. **International Journal of Food Properties**, v. 24, p. 1642–1657, 2021.

PUSPAWATI, N. M. *et al*. Effect of different papain concentrations on the properties of chicken skin protein hydrolysates. **International Journal of Design & Nature and Ecodynamics**, v. 16, p. 445–450, 2021.

QUEIROZ, A. L. M. *et al*. Functional protein hydrolysate from goat by-products: optimization and characterization studies. **Food Bioscience**, v. 20, p. 19–27, 2017.

RE, R. *et al*. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, p. 1231–1237, 1999.

RIEGER, T. J. *et al*. Proteolytic system of *Bacillus* sp. CL18 is capable of extensive feather degradation and hydrolysis of diverse protein substrates. **British Poultry Science**, v. 58, p. 329–335, 2017.

RIVERA, J. A. *et al*. Composition and protein fractions of different meat by-products used for petfood compared with mechanically separated chicken (MSC). **Meat Science**, v. 55, p. 53–59, 2000.

RIVERO-PINO, F.; ESPEJO-CARPIO, F. J.; GUADIX, E. M. Antidiabetic food-derived peptides for functional feeding: production, functionality and in vivo evidences. **Foods**, v. 9, artigo 983, 2020.

RIYADI, P. H. *et al*. Tilapia viscera hydrolysate extract alleviates oxidative stress and renal damage in deoxycorticosterone acetate-salt-induced hypertension rats. **Veterinary World**, v. 13, p. 2477–2483, 2020.

SAEED, M. *et al*. Characterization of peptides fractions produced through enzymatic hydrolysis of meat byproducts for their antihypertensive and antioxidant activities. **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, v. 57, p. 545–551, 2020.
SAI-UT, S. *et al*. Antioxidant activity of gelatin hydrolysate produced from fish skin gelatin using extracellular protease from *Bacillus amyloliquefaciens* H11. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 39, p. 394–403, 2015.

SAMARANAYAKA, A. G. P.; LI-CHAN, E. C. Y. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. **Journal of Functional Foods**, v. 3, p. 229–254, 2011.

SÁNCHEZ, A.; VÁZQUEZ, A. Bioactive peptides: A review. **Food Quality and Safety**, v. 1, p. 29–46, 2017.

SEONG, P. N. *et al*. Characterization of edible pork by-products by means of yield and nutritional composition. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 34, p. 297–306, 2014.

SEONG, P. N. *et al*. Characterization of chicken by-products by means of proximate and nutritional compositions. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 35, p. 179–188, 2015.

SEPÚLVEDA, C. T.; ZAPATA, J. E. Effects of enzymatic hydrolysis conditions on the antioxidant activity of red tilapia (*Oreochromis* spp.) viscera hydrolysates. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 21, 1249–1258, 2020.

SEPÚLVEDA, C. T. *et al*. The preferential use of a soy-rapeseed lecithin blend for the liposomal encapsulation of a tilapia viscera hydrolysate. **LWT - Food Science and Technology**, v. 139, artigo 110530, 2021.

SHALABY, M. *et al*. Fish scale collagen preparation, characterization and its application in wound healing. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 28, p. 166–178, 2020.

SHARMA, M. *et al*. A review on microbial alkaline protease: An essential tool for various industrial approaches. **Industrial Biotechnology**, v. 15, p. 69–78, 2019.

SHARMA, V. *et al*. Agro-industrial food waste as a low-cost substrate for sustainable production of industrial enzymes: a critical review. **Catalysts**, v. 12, artigo 1373, 2022.
SHIRSATH, A. P.; HENCHION, M. M. Bovine and ovine meat co-products valorization opportunities: A systematic literature review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 118, p. 57–70, 2021.

SIDDIQI, N. J.; ALHOMIDA, A. S. Investigation into the distribution of total, free, peptide-bound, protein-bound, soluble- and insoluble-collagen hydroxyproline in various bovine tissues. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, p. 154–158, 2003.

SIERRA, L. *et al*. Antioxidant peptides derived from hydrolysates of red tilapia (*Oreochromis* sp.) scale. **LWT - Food Science and Technology**, v. 146, artigo 111631, 2021.

SINGH, S.; BAJAJ, B. K. Potential application spectrum of microbial proteases for clean and green industrial production. **Energy, Ecology and Environment**, v. 2, p. 370–386, 2017.

SOLANKI, P. *et al*. Microbial proteases: ubiquitous enzymes with innumerable uses. **3 Biotech**, v. 11, artigo 428, 2021.

SOUZA, T. S. P. *et al*. Microbial peptidase in food processing: current state of the art and future trends. **Catalysis Letters**, v. 153, p. 114–137, 2023.

SRIVASTAVA, B. *et al*. Microbial keratinases: An overview of biochemical characterization and its eco-friendly approach for industrial applications. **Journal of Cleaner Production**, v. 252, artigo 119847, 2020.

SUN, X. *et al*. Purification and characterization of antioxidant peptides from yak (*Bos grunniens*) bone hydrolysates and evaluation of cellular antioxidant activity. **Journal of Food Science and Technology**, v. 58, p. 3106–3119, 2021.

TADESSE, S. A.; EMIRE, S. A. Production and processing of antioxidant bioactive peptides: A driving force for the functional food market. **Heliyon**, v. 6, artigo e04765, 2020.

TANG, X. *et al*. Peptide fractionation and free radical scavenging activity of zein hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 587–593, 2010.
TAVANO, O. L. *et al*. Biotechnological applications of proteases in food technology. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, p. 412–436, 2018.

TEDESCHI, T. *et al*. Enzymatic digestion of calf fleshing meat by-products: antioxidant and anti-tyrosinase activity of protein hydrolysates, and identification of fatty acids. **Foods**, v. 10, artigo 755, 2021.

TIMORSHINA, S.; POPOVA, E.; OSMOLOVSKIY, A. Sustainable applications of animal waste proteins. **Polymers**, v. 14, artigo 1601, 2022.

TOLDRÁ, F., *et al*. Innovations in value-addition of edible meat by-products. **Meat Science**, v. 92, p. 290–296, 2012.

TOLDRÁ, F.; MORA, L.; REIG, M. New insights into meat by-product utilization. **Meat Science**, v. 120, p. 54–59, 2016.

TOLDRÁ, F. *et al*. Recent progress in enzymatic release of peptides in foods of animal origin and assessment of bioactivity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, p. 12842–12855, 2020.

TRĘBACZ, H.; BARZYCKA, A. Mechanical properties and functions of elastin: an overview. **Biomolecules**, v. 13, artigo 574, 2023.

VAN DIJL, J. M.; HECKER, M. *Bacillus subtilis*: From soil bacterium to super-secreting cell factory. **Microbial Cell Factories**, v. 12, n. 1, p. 1–6, 2013.

VÁZQUEZ, J. A. *et al*. Valorization of aquaculture by-products of salmonids to produce enzymatic hydrolysates: process optimization, chemical characterization and evaluation of bioactives. **Marine Drugs**, v. 17, artigo 676, 2019.

VERMA, A. K. *et al*. Antioxidant and antimicrobial efficacy of peptidic hydrolysate obtained from porcine blood. **Agricultural Research**, v. 8, p. 116–124, 2019.

VIEIRA, E. F.; PINHO, O.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O. Bio-functional properties of sardine protein hydrolysates obtained by brewer's spent yeast and commercial proteases. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, p. 5414–5422, 2017.

VRANOVA, V.; REJSEK, K.; FORMANEK, P. Proteolytic activity in soil: a review. **Applied Soil Ecology**, v. 70, p. 23-32, 2013.

WIRIYAPHAN, C. *et al*. Chemical and cellular antioxidative properties of threadfin bream (*Nemipterus* spp.) surimi byproduct hydrolysates fractionated by ultrafiltration. **Food Chemistry**, v. 167, p. 7–15, 2015.

WU, R. *et al*. Preparation of antioxidant peptides from salmon byproducts with bacterial extracellular proteases. **Marine Drugs**, v. 15, artigo 4, 2017.

WU, R. *et al*. Antioxidant and anti-freezing peptides from salmon collagen hydrolysate prepared by bacterial extracellular protease. **Food Chemistry**, v. 248, p. 346–352, 2018.

XIAO, F. *et al*. Guidelines for antioxidant assays for food components. **Food Frontiers**, v. 1, p. 60–69, 2020.

XIONG, G. Y. *et al*. Process optimization and the relationship between the reaction degree and the antioxidant activity of Maillard reaction products of chicken liver protein hydrolysates. **Poultry Science**, v. 99, p. 3733–3741, 2020.

XU, J. *et al*. *In vitro* and *in vivo* anti-oxidation and anti-fatigue effect of monkfish liver hydrolysate. **Food Bioscience**, v. 18, p. 9–14, 2017.

YAGHOUBZADEH, Z. *et al*. Antioxidant activity and anticancer effect of bioactive peptides from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin hydrolysate. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 26, p. 625–632, 2020.

YAN, M.; TAO, H.; QIN, S. (2016) Effect of enzyme type on the antioxidant activities and functional properties of enzymatic hydrolysates from sea cucumber (*Cucumaria frondosa*) viscera. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 25, p. 940–952, 2016.

YANG, X. *et al*. Optimization of collagenase production by *Pseudoalteromonas* sp. SJN2 and application of collagenases in the preparation of antioxidative hydrolysates. **Marine Drugs**, v. 15, artigo 377, 2017.

YANG, J. *et al*. Investigation of optimal conditions for production of antioxidant peptides from duck blood plasma: response surface methodology. **Poultry Science**, v. 99, p. 7159–7168, 2020.

YATHISHA, U. G.; KARUNASAGAR, I.; MAMATHA, B. S. Bioactivity and functional properties of protein hydrolysate from muscle and visceral waste of ribbon fish (*Lepturacanthus savala*) extracted by three different proteolytic enzymes. **Journal of Biologically Active Products from Nature**, v. 11, p. 363–379, 2021.

YU, H.-C. *et al*. Antioxidant properties of porcine liver proteins hydrolyzed using *Monascus purpureus*. **Food Science and Biotechnology**, v. 26, p. 1217–1225, 2017.

ZENG, W.-C. *et al*. Purification and characterization of a novel antioxidant peptide from bovine hair hydrolysates. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 948–954, 2015.

ZHANG, Y.; DONG, Y.; DAI, Z. Antioxidant and cryoprotective effects of bone hydrolysates from bighead carp (*Aristichthys nobilis*) in freeze-thawed fish fillets. **Foods**, v. 10, artigo 1409, 2021.

ZHENG, Z. *et al*. A novel antioxidative peptide derived from chicken blood corpuscle hydrolysate. **Food Research International**, v. 106, p. 410–419, 2018.

ZHENG, Z. *et al*. Effect of microwave combined with ultrasonic pretreatment on flavor and antioxidant activity of hydrolysates based on enzymatic hydrolysis of bovine bone. **Food Bioscience**, v. 44, artigo 101399, 2021.

ZHONG, S. *et al*. Fish protein isolates recovered from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) by-products using alkaline ph solubilization and precipitation. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 25, p. 400–413, 2016.

ZHU, K.; ZHOU, H.; QIAN, H. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1296–1302, 2006

ZHU, Y. *et al*. Food protein-derived antioxidant peptides: molecular mechanism, stability and bioavailability. **Biomolecules**, v. 12, artigo 1622, 2022.

ZOU, T.-B. *et al*. The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. **Molecules**, v. 21, artigo 72, 2016.