UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
***CAMPUS* CERRO LARGO**
CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL E SANITÁRIA

RODRIGO ALMEIDA DE LIMA

PRODUÇÃO E APLICAÇÕES DE UMA PROTEASE BACTERIANA:
MANEJO DE FILMES DE RAIOS-X E VALORIZAÇÃO DE SUBPRODUTOS DE ABATEDOUROS

CERRO LARGO
2025

RODRIGO ALMEIDA DE LIMA

PRODUÇÃO E APLICAÇÕES DE UMA PROTEASE BACTERIANA:

MANEJO DE FILMES DE RAIOS-X E VALORIZAÇÃO DE SUBPRODUTOS DE ABATEDOUROS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de Bacharel.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Joner Daroit

CERRO LARGO

2025

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Lima, Rodrigo Almeida de
PRODUÇÃO E APLICAÇÕES DE UMA PROTEASE BACTERIANA: MANEJO DE FILMES DE RAIO-X E VALORIZAÇÃO DE SUBPRODUTOS DE ABATEDOUROS / Rodrigo Almeida de Lima. -- 2025.
27 f.:il.

Orientador: Dr. Daniel Joner Daroit

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de Bacharelado em Engenharia Ambiental e Sanitária, Cerro Largo,RS, 2025.

1. enzimas proteolíticas. 2. recuperação de prata. 3. hidrolisados proteicos. 4. bioatividades. 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).

RODRIGO ALMEIDA DE LIMA

PRODUÇÃO E APLICAÇÕES DE UMA PROTEASE BACTERIANA:
MANEJO DE FILMES DE RAIOS-X E VALORIZAÇÃO DE SUBPRODUTOS DE ABATEDOUROS

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 28/11/2025.

BANCA EXAMINADORA

gov.br
Documento assinado digitalmente
DANIEL JONER DAROIT
Data: 09/12/2025 09:16:40-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

_____
Prof. Dr. Daniel Joner Daroit – UFFS
Orientador

MICAEL BENITO BOURSCHEID BRUM:02030114065
Assinado de forma digital por MICAEL BENITO BOURSCHEID BRUM:02030114065
Dados: 2025.12.09 10:49:23 -03'00'

_____
Eng. Micael Benito Bourscheid Brum - UFFS
Avaliador

gov.br
Documento assinado digitalmente
MANUELA GOMES CARDOSO
Data: 09/12/2025 16:30:32-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

_____
Profª. Drª. Manuela Gomes Cardoso – UFFS
Avaliadora

Dedico este trabalho a minha mãe
Onilda, e meu pai Adão (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela força e sabedoria em cada etapa desta caminhada. Sem Sua presença, nada teria sido possível.

À Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), por ter sido o espaço que me proporcionou crescimento acadêmico, humano e profissional. A cada aula, projeto e desafio, pude perceber que o conhecimento transforma e nos torna mais conscientes do nosso papel no mundo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Daniel Joner Daroit, pela orientação cuidadosa, paciência, confiança e dedicação ao longo de todo o desenvolvimento deste trabalho. Sua experiência, incentivo e entusiasmo científico foram essenciais para que esta pesquisa se concretizasse.

À minha mãe, Onilda, por todo o amor incondicional, apoio e fé em mim, mesmo nos momentos em que duvidei de mim mesmo. Ao meu pai, Adão, que já não está presente fisicamente, mas cuja memória e ensinamentos me acompanharam e me deram forças em cada conquista.

À minha namorada, Gabriela, por ter sido presença constante, oferecendo carinho, paciência e incentivo, e também por contribuir tecnicamente, compartilhando seu conhecimento e entusiasmo pela ciência.

Um agradecimento especial à equipe do Laboratório 112, que tornou a pesquisa mais leve, divertida e produtiva. Entre experimentos, muitas xícaras de café e incontáveis discussões sobre proteases, a convivência e a amizade de vocês foram fundamentais para que este trabalho fosse realizado com alegria.

Aos amigos que ficaram pelo caminho, mas que continuam próximos, e aos novos amigos que conquistei nessa jornada, que não foi fácil, mas que se tornou possível ao lado de pessoas incríveis.

Por fim, agradeço a todos que acreditaram em mim, direta ou indiretamente, e que de alguma forma contribuíram para que este sonho se tornasse realidade. Este trabalho é fruto não apenas de esforço individual, mas do apoio coletivo de todos que caminharam comigo.

“Na natureza nada se cria, nada se perde, tudo se transforma. A matéria muda de forma, mas permanece. Assim, o que chamamos de resíduo é, na verdade, matéria à espera de um novo propósito.”

— Antoine Lavoisier (1789)

RESUMO

O descarte incorreto de filmes de raios-X ocasiona impactos ecológicos e, além disso, os métodos físicos e químicos de recuperação da prata contida nestes filmes geram gases e efluentes problemáticos. Subprodutos de origem animal, como as vísceras, são abundantes, e seu manejo inadequado também representa riscos aos ambientes. Processos microbianos e enzimáticos podem ser opções adequadas nos contextos de manejo e reciclagem destes subprodutos e resíduos. Neste sentido, objetivou-se obter a protease bruta de *Bacillus* sp. CL33A, para então aplicar esta enzima na recuperação de prata de filmes radiográficos e na obtenção de hidrolisados proteicos bioativos a partir de subprodutos de suínos. Usando farinha de vísceras (FV; 10 g/L) como substrato de baixo custo, o pico de produção de proteases por *Bacillus* sp. CL33A ocorreu no 4º dia de cultivo (604 U/mL). Além da protease, foi possível obter também hidrolisados proteicos antioxidantes, ampliando a relevância deste processo microbiano e a valorização da FV. A protease bruta removeu em ~4 min (55 °C) a camada de gelatina-prata de filmes de raios-X, e diluições da protease (20-80%) necessitaram maiores períodos (5,8-9,4 min). Já a remoção química ocorreu em 8,7 min. A protease e suas diluições foram efetivas por três ciclos de remoção, requerendo 8,5-12,4 min no 3º ciclo. A protease bruta também foi capaz de hidrolisar (4 h; 55 °C) fígado, rins, pulmões e baço suínos. Os hidrolisados proteicos obtidos exibiram potencial antioxidante superior a estes órgãos viscerais não hidrolisados, indicando que a hidrólise liberou peptídeos com capacidade de transferência de elétrons e quelação de Fe^{2+}. As aplicações da protease de *Bacillus* sp. CL33A são promissoras para agregar valor a subprodutos de abatedouros e recuperar prata de filmes radiográficos, mitigando potenciais impactos ambientais e contribuindo para uma maior sustentabilidade em processos e produtos.

Palavras-chave: enzimas proteolíticas; recuperação de prata; hidrolisados proteicos; bioatividades.

ABSTRACT

The incorrect disposal of X-ray films causes ecological impacts, and the physical and chemical methods used for recovering the silver contained in these films generate problematic gases and effluents. Animal by-products, such as viscera, are abundant, and their inadequate management also poses risks to the environment. Microbial and enzymatic processes may be suitable options for the management and recycling of these by-products and wastes. Therefore, this study aimed to obtain the crude protease from *Bacillus* sp. CL33A, and then apply this enzyme for silver recovery from radiographic films and to obtain bioactive protein hydrolysates from porcine by-products. Using viscera meal (FV; 10 g/L) as a low-cost substrate, the peak of protease production by *Bacillus* sp. CL33A occurred on the 4th day of cultivations (604 U/mL). In addition to the protease, it was also possible to obtain antioxidant protein hydrolysates, increasing the relevance of this microbial process and FV valorization. The crude protease removed the gelatin-silver layer from X-ray films in ~4 min (55 °C), and protease dilutions (20-80%) required longer periods (5.8-9.4 min). Chemical removal occurred in 8.7 min. The protease and its dilutions were effective for three removal cycles, requiring 8.5-12.4 min in the 3rd cycle. The crude protease was also able to hydrolyze (4 h; 55 °C) porcine liver, kidneys, lungs and spleen. The obtained protein hydrolysates exhibited superior antioxidant potential as compared to these non-hydrolyzed visceral organs, indicating that the hydrolysis released peptides with electron-transfer and Fe^{2+}-chelating capacities. The applications of the *Bacillus* sp. CL33A protease are promising for adding value to slaughterhouse by-products and recovering silver from radiographic films, mitigating potential environmental impacts and contributing to a greater sustainability in processes and products.

Keywords: proteolytic enzymes; silver recovery; protein hydrolysates; bioactivities.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABRA	Associação Brasileira de Reciclagem Animal
ABTS	Ácido 2,2’-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
Abs	Absorbância
ANOVA	Análise de Variância
Ca^{2+}	Íon cálcio
$CuSO_4$	Sulfato de cobre
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
Fe^{2+}	Íon ferroso
Fe^{3+}	Íon férrico
$FeCl_3$	Cloreto férrico
$FeSO_4$	Sulfato ferroso
FV	Farinha de vísceras
g	Força centrífuga relativa (gravidade)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
K_2HPO_4	Fosfato dipotássico
KH_2PO_4	Fosfato monopotássico
L	Litro
m/m	Massa por massa
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
PCA	Ágar Padrão para Contagem
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
SmF	Submerged Fermentation (Fermentação Submersa)
SSF	Solid-State Fermentation (Fermentação em Estado Sólido)
TCA	Ácido tricloroacético
Tris-HCl	Tampão Tris(hidroximetil) aminometano-cloridrato
U	Unidade de atividade enzimática
UFFS	Universidade Federal da Fronteira Sul

1 INTRODUÇÃO

As atividades agroindustriais, definidas como aquelas que envolvem o processamento dos produtos de origem animal e vegetal gerados pela pecuária e agricultura, são responsáveis pela produção de imensas quantidades de subprodutos e efluentes (Boboua *et al*., 2024). No contexto nacional, por exemplo, pelo menos 14 milhões de toneladas de subprodutos de origem animal são geradas por ano pelas atividades de frigoríficos e abatedouros (ABRA, 2024). Estes subprodutos são representados pelos ossos, vísceras, sangue, gorduras, peles, escamas, pelos, penas, aparas de carne e partes condenadas das carcaças (Alao *et al*., 2017).

Pelas enormes quantidades que são geradas, o manejo adequado destes subprodutos é necessário. Preferência vem sendo dada a estratégias que objetivem não somente a destinação adequada, de modo a evitar a poluição do solo, da água, do ar, e problemas de saúde pública, mas que também busquem agregar valor aos subprodutos de origem agroindustrial (Taneja *et al*., 2023). Estas abordagens podem contribuir para a sustentabilidade ambiental e industrial, fazendo parte da busca por modelos de economia circular, onde os subprodutos podem servir como matérias-primas renováveis e de baixo custo para a obtenção de produtos, em contraponto à lógica tradicionalmente aplicada de “produzir-utilizar-descartar”, que está vinculada à economia linear (Bastos *et al*., 2022).

As vísceras, que incluem os órgãos internos dos animais, estão entre os principais subprodutos de abatedouros e frigoríficos (Martínez-Alvarez et al., 2015). A maior parte destes subprodutos é destinada às indústrias de reciclagem animal (também conhecidas como graxarias), onde são processados em condições de elevada temperatura e pressão. A partir deste processo são obtidas as farinhas de origem animal, ricas em proteína, que são geralmente utilizadas como ingredientes em rações animais e fertilizantes (Wang et al., 2024).

Contudo, processos biotecnológicos vêm sendo reconhecidos como alternativas adequadas para melhor aproveitar os subprodutos agroindustriais e biomassas abundantes. Ao convertê-los em produtos úteis, expandindo assim as possibilidades de aplicações comerciais e industriais, o bioprocessamento é parte integrante das abordagens da economia circular (Boboua *et al*., 2024). Uma dessas estratégias é a utilização de subprodutos como substratos em processos fermentativos para a produção de bioprodutos microbianos, como bioplásticos, pigmentos, surfactantes e enzimas de interesse tecnológico (Taneja *et al*., 2023). Dentre os produtos microbianos, especial atenção vem sendo dedicada à obtenção de enzimas. Estes catalisadores biológicos têm adquirido crescente importância em diversas aplicações industriais devido à especificidade das reações que realizam (Sharma *et al*., 2022).

Nesta perspectiva, a utilização de subprodutos agroindustriais como substratos para os cultivos microbianos (fermentações), além de potencialmente fornecer os nutrientes necessários ao desenvolvimento dos microrganismos e a consequente produção de enzimas, também contribui para a diminuição dos custos envolvidos na obtenção destes biocatalisadores (Pereira *et al*., 2024). Cabe notar também que, durante os processos fermentativos, a atuação dos microrganismos e suas enzimas pode liberar moléculas bioativas, que são bioprodutos de elevado valor agregado. No caso de substratos de origem animal, os responsáveis pelas

atividades biológicas são geralmente peptídeos liberados a partir das proteínas constituintes dos subprodutos (Martí-Quijal *et al*., 2021).

Em relação às enzimas microbianas, as proteases vêm sendo aplicadas em indústrias de rações, alimentos, bebidas, têxteis, couro e detergentes. Sua capacidade de hidrolisar ligações peptídicas em proteínas também torna as proteases úteis no gerenciamento de resíduos, como no caso da recuperação de prata de filmes de raios-X descartados (Song *et al*., 2023). Os filmes de raios-X são formados por uma base plástica, sobre a qual é adicionada uma camada de gelatina contendo sais de prata. Considerando que cerca de 2 bilhões de filmes de raios-X são gerados por ano no mundo, que a prata é metal valioso que corresponde a 1,5% da massa destes filmes, a reciclagem da prata é tema importante (Gomez *et al*., 2022). De fato, estima-se que a recuperação da prata de filmes residuais de raios-X represente aproximadamente 10% do total da prata reciclada por ano no mundo (Silver Institute, 2024).

A recuperação da prata destes filmes é geralmente realizada utilizando métodos físicos ou químicos. O método físico é a incineração; contudo, além de envolver altos gastos energéticos e de não possibilitar a recuperação da base plástica, requer rigorosos controles quanto à emissão de gases tóxicos e fuligens. Já os métodos químicos utilizam bases ou ácidos concentrados, o que dá origem a efluentes de elevada toxicidade e periculosidade ambiental que, ao mesmo tempo, possuem difícil tratamento (Bhavikatti *et al*., 2020). Assim, o uso de proteases para a reciclagem da prata a partir de filmes de raios-X gerados pelo setor de saúde tem recebido destaque. O fundamento desta estratégia é a capacidade das enzimas em hidrolisar a gelatina, liberando como consequência a prata associada a esta proteína. Os métodos enzimáticos são vantajosos em relação àqueles tradicionalmente usados devido à menor demanda energética e pelo fato de ocorrerem em condições moderadas de temperatura e pH (Abdella; Ahmed, 2025).

Enzimas proteolíticas também têm sido usadas para obter hidrolisados proteicos bioativos, que podem beneficiar a saúde e a nutrição humana e animal. Hidrolisados antioxidantes, por exemplo, podem aliviar doenças relacionadas ao estresse oxidativo e podem ser usados para melhorar a estabilidade oxidativa de produtos alimentícios (Borrajo *et al*., 2019). Como as atividades biológicas estão associadas aos peptídeos liberados durante a hidrólise, há contínua exploração de proteases e substratos proteicos adequados para a geração de hidrolisados bioativos (Brandelli; Daroit, 2024). Os subprodutos de abatedouros, ricos em proteína, podem ser fontes promissoras de hidrolisados proteicos antioxidantes. Esta abordagem é considerada como um importante passo para a valorização e para o manejo destes subprodutos, beneficiando a sustentabilidade da indústria da carne (Borrajo *et al*., 2019).

Considerando a crescente relevância de processos microbianos e enzimáticos para o desenvolvimento de processos ecologicamente adequados e sustentáveis, este trabalho objetivou obter proteases de *Bacillus* sp. CL33A por meio de cultivos submersos (SmF) e, posteriormente, aplicar a protease bruta como agente para a recuperação da prata de filmes de raios-X e como e para a produção de hidrolisados proteicos antioxidantes a partir de subprodutos de abatedouros.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICRORGANISMO, PREPARO DE INÓCULO E PRODUÇÃO DE PROTEASES

A bactéria *Bacillus* sp. CL33A foi usada na produção de proteases (Oliveira *et al*., 2017). A cepa foi mantida a 7 °C em placas de Ágar Padrão para Contagem (PCA).

Para preparar os inóculos, a bactéria foi cultivada em placas de PCA (30 °C, 24 h). As colônias bacterianas foram coletadas e adicionadas a tubos contendo solução salina (8,5 g/L NaCl) estéril. Estas suspensões bacterianas, ajustadas para ~1 unidade de absorbância (Abs) a 600 nm em espectrofotômetro, foram usadas como inóculo.

Os cultivos para a produção de proteases ocorreram em Erlenmeyers (250 mL) contendo 50 mL de meio mineral (K_2HPO_4, 0,3 g/L; KH_2PO_4, 0,4 g/L; NaCl, 0,5 g/L; pH 7,5), adicionado de farinha de vísceras de frango (FV; Base Indústria e Comércio de Óleos e Proteínas Ltda.) em concentração de 10 g/L. Após esterilização em autoclave (121 °C, 15 min) e resfriamento, os meios de cultivo, em triplicatas, foram inoculados com 1 mL de suspensão bacteriana. A incubação ocorreu a 30 °C, em estufa com agitação orbital (125 rpm), por 0 a 6 dias.

Amostras dos cultivos (0,5 mL) foram coletadas diariamente de forma asséptica, centrifugadas (10.000 × *g*, 10 min), e os sobrenadantes (protease bruta) foram usados na avaliação da atividade proteolítica.

2.1.1 Determinação da atividade proteolítica

Os sobrenadantes de cultivo (10 µL) foram adicionados de 190 µL de tampão Tris-HCl (100 mM; pH 8,0) e 300 µL de azocaseína (10 g/L, no mesmo tampão). Estas misturas foram incubadas a 55 °C por 15 min e então adicionou-se 600 µL de ácido tricloroacético (TCA; 100 g/L) para finalizar as reações.

Após centrifugação (10.000 × *g*, 5 min), os sobrenadantes da reação (800 µL) foram adicionados a 200 µL de NaOH (1,8 M). A absorbância (Abs) foi determinada a 420 nm em espectrofotômetro (Oliveira *et al*., 2017). Água destilada foi usada no lugar das amostras para os brancos. Para os controles, o TCA foi adicionado antes dos sobrenadantes de cultivo. Os ensaios foram realizados em triplicata. Uma unidade de protease (U) foi definida como a quantidade de enzima a aumentar 0,1 unidade de Abs a 420 nm nas condições do ensaio.

2.1.2 Proteínas solúveis e atividade antioxidante em sobrenadantes de cultivo

Foram avaliados sobrenadantes do início dos cultivos (dia 0) e aqueles coletados no ponto de máxima produção de protease, em ensaios em triplicata.

A concentração de proteínas solúveis foi determinada através do método de Lowry *et al*. (1951). Foram preparadas as soluções “A” (Na_2CO_3, 20 g/L; tartarato de sódio e potássio, 0,2 g/L; e NaOH 2 M, 50 mL/L) e “B” ($CuSO_4$, 5 g/L), para obter a solução “C” (50 partes de “A”:1 parte de “B”). Nos ensaios, utilizou-se 100 µL dos sobrenadantes (diluídos com água destilada, se necessário) e 2,5 mL da solução “C”. Esta mistura permaneceu em temperatura ambiente, no escuro, por 15 min, e então adicionou-se 300 µL do reagente de Folin-Ciocalteu (1 N). Passados 30 min em temperatura ambiente, no escuro, a Abs foi mensurada em espectrofotômetro

a 750 nm. Nos brancos utilizou-se água destilada (100 µL). Curva padrão de albumina sérica bovina foi usada para interpretar os resultados, apresentados em mg proteína/mL.

As atividades antioxidantes foram avaliadas por meio da eliminação do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (Brand-Williams *et al*., 1995), capacidade de quelação de Fe^{2+} (Chang *et al*., 2007), e poder redutor (Zhu *et al*., 2006). A eliminação do radical DPPH foi avaliada com 1 mL de radical DPPH (60 µM, em metanol) e 25 µL de amostra. Nos brancos, foram utilizados 25 µL de água destilada. Após incubação (12 h) no escuro à temperatura ambiente, a absorbância foi lida a 517 nm. A eliminação foi calculada como:

$$\textit{Captura do radical DPPH (\%)} = [(Abs_{branco} - Abs_{amostra}) / Abs_{branco}] \times 100.$$

A quelação de Fe^{2+} foi avaliada misturando-se 50 µL de amostra com 3,75 mL de água destilada e 100 µL de $FeSO_4$ (2 mM). Nos brancos, as amostras foram substituídas por água destilada. Após 5 minutos, foram adicionados 200 µL de ferrozina (3-(2-piridil)-5,6-bis-(ácido 4-fenilsulfônico)-1,2,4-triazina; 5 mM). A absorbância a 562 nm foi medida após 10 min. A quelação foi calculada como:

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

O poder redutor foi determinado adicionando-se 1 mL da amostra a 2,5 mL de tampão fosfato (200 mM; pH 6,6) e 2,5 mL de ferricianeto de potássio (10 g/L). Nos brancos, as amostras foram substituídas por água destilada. As misturas foram incubadas (50 °C, 20 min), adicionadas de 2,5 mL de TCA (100 g/L) e centrifugadas (3.000 × *g*; 10 min). Aos sobrenadantes da reação (2,5 mL) foram adicionados 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de $FeCl_3$ (1 g/L), e a absorbância (Abs) foi então lida a 700 nm (Abs_{700}). O poder redutor foi calculado como:

$$\textit{Poder redutor (}Abs_{700}\textit{)} = (Abs_{amostra} - Abs_{branco}).$$

2.2 APLICAÇÃO DA PROTEASE BRUTA NA REMOÇÃO DA GELATINA DE FILMES DE RAIO-X

Filmes de raios-X foram lavados com água destilada, limpos com algodão umedecido com etanol 70%, secos, e cortados (~2,0 × 1,5 cm). Para os testes, 10 mL de protease bruta (~600 U/mL) ou de diluições da protease (4:1, 1:1, 1:4, em tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,0) foram pré-incubados (55 °C, 10 min), e as reações foram então iniciadas pela adição de quatro pedaços de raios-X (~0,76 g).

Os meios reacionais foram incubados a 55 °C até a completa remoção da camada de gelatina-prata (Ciclo 1). Nos brancos e controles negativos, a enzima foi substituída por tampão e pela protease bruta inativa (100 °C, 10 min), respectivamente. Nos controles positivos utilizou-se solução de NaOH (1,5 M) a 55 °C. Os tempos (s) necessários para a remoção, bem como a diminuição da massa dos filmes, foram registrados (Cavello *et al*., 2013).

Avaliou-se também o reuso da protease. Após a remoção da gelatina (Ciclo 1), as bases plásticas dos filmes foram retiradas e quatro novos pedaços de filme foram adicionados (início do Ciclo 2). Após a remoção da gelatina, o procedimento foi repetido novamente (Ciclo 3). Os tempos (s) necessários para a remoção foram registrados. Todos os testes acima indicados foram realizados em triplicata.

2.3 PRODUÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS ANTIOXIDANTES

Quatro subprodutos suínos (fígado, pulmões, rins e baço), coletados de abatedouro local, foram usados como substratos para a produção de hidrolisados proteicos. Inicialmente, a gordura visível foi removida usando bisturi, e os órgãos foram triturados em água destilada (1:1). O material triturado foi tratado termicamente (90 °C; 20 min) para inativação de enzimas endógenas e, após resfriamento, o material processado foi submetido à hidrólise enzimática.

Em frascos Erlenmeyer (125 mL), os subprodutos processados (1,75 g, massa úmida) foram adicionados de tampão Tris-HCl (100 mM; pH 8,0; 5 mM Ca^{2+}) de modo a atingir concentração final de 70 g/L em um volume total de 25 mL após a adição da protease. Estas misturas foram pré-incubadas (55 °C; 20 min) e as reações foram iniciadas pela adição da protease bruta (7% v/v; 1,75 mL; ~600 U/mL; 1.050 U). As incubações ocorreram a 55 °C, por 0 h e 4 h, em banho-maria com agitação.

As reações foram finalizadas por fervura (20 min) e, após resfriamento e centrifugação (10.000 × *g*, 30 min), os sobrenadantes (hidrolisados) foram coletados e avaliados quanto à concentração de proteínas solúveis e atividades antioxidantes. Nos controles, utilizou-se a protease inativa (100 °C; 10 min). Todos os experimentos de hidrólise, incluindo os controles, foram realizados em triplicatas.

2.3.1 Determinação de proteínas solúveis e atividades antioxidantes

As determinações do conteúdo de proteínas solúveis, da captura do radical DPPH, capacidade de quelação de Fe^{2+} e poder redutor foram determinados conforme descrito na Seção 2.1.2.

O potencial antioxidante foi também avaliado pela captura do radical ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) (Re *et al*., 1999). O radical foi preparado reagindo 5 mL de solução de ABTS (7 mM) com 88 µL de solução de persulfato de potássio (140 mM). Esta mistura permaneceu no escuro, em temperatura ambiente, por 12-16 h antes do uso. A solução do radical foi diluída em tampão fosfato salino (5 mM; pH 7,4) até atingir Abs de 0,70 ± 0,02 a 734 nm. Nos ensaios, 5 µL de sobrenadante foram adicionados a 1 mL da solução diluída do radical ABTS, sendo que a Abs a 734 nm foi lida após 10 min. Nos brancos, foi usada água destilada no lugar das amostras. Os resultados foram calculados como:

$$\textit{Captura do radical ABTS (\%)} = [(Abs_{branco} - Abs_{amostra}) / Abs_{branco}] \times 100.$$

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados das replicatas são apresentados como média ± desvio padrão. Comparações entre médias foram realizadas por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey, e consideradas diferentes se $p < 0,05$. Para a comparação entre médias de hidrolisados e controles obtidos em tempo fixo de hidrólise, utilizou-se o teste *t* de Student, e as médias foram consideradas distintas se $p < 0.05$.

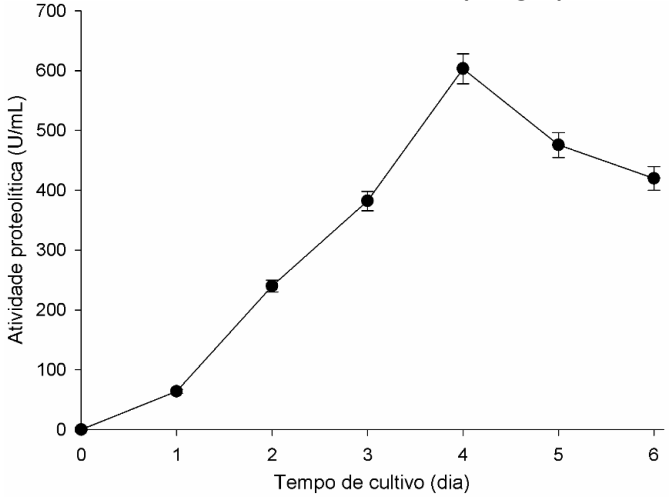
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PRODUÇÃO DE PROTEASE

Bacillus sp. CL33A é uma bactéria proteolítica isolada de local com deposição de matéria orgânica (Oliveira *et al*., 2017). Estudo recente indicou sua capacidade de produzir proteases durante SmF realizados em tempo fixo (4 dias) usando várias biomassas de baixo custo como substratos. A maior produção de proteases ocorreu com farinha de vísceras (FV), enquanto que os rendimentos enzimáticos foram 20-78% menores usando farelo de canola, farelo de girassol, farelo de trigo, farinha de sangue, ou farinha de penas (Azambuja *et al*., 2025).

A FV foi selecionada para, neste estudo, avaliar o efeito do tempo de cultivo sobre a produção de proteases, que foi acompanhado por 6 dias (Fig. 1). Observou-se acúmulo das enzimas ao longo dos cultivos, com a máxima atividade proteolítica sendo atingida no 4º dia (604 U/mL).

Figura 1 – Produção de proteases por *Bacillus* sp. CL33A durante cultivos submersos contendo farinha de vísceras (10 g/L) como substrato.



Após o pico de atividade ter sido alcançado, houve redução da atividade enzimática (Dias 5 e 6), sugerindo tanto a diminuição da produção de proteases quanto a ocorrência de autólise, um fenômeno onde as proteases hidrolisam e inativam outras proteases (Bose *et al*., 2014).

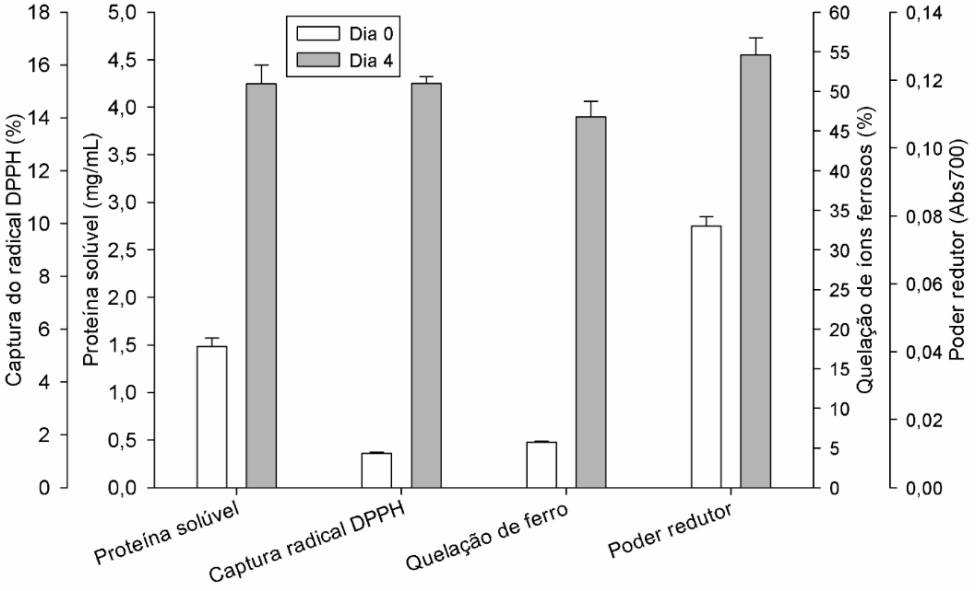
Os cultivos com *Bacillus* sp. CL33A foram inicialmente propostos para obter proteases. No entanto, avaliou-se também o conteúdo de proteínas solúveis e a atividade antioxidante dos sobrenadantes de cultivo (Dias 0 e 4). No 4º dia, ponto onde foi detectado o pico de produção de proteases (Fig. 1), observou-se maior concentração de proteínas solúveis (Fig. 2A) e também maiores atividades antioxidantes (Fig. 2B), quando comparadas àquelas detectadas no Dia 0.

Isso indica que as proteases extracelulares atuaram sobre a FV (que possui 60-65% de proteína), liberando peptídeos com potencial antioxidante superior ao do substrato no Dia 0. Estas atividades antioxidantes são mediadas pela habilidade dos peptídeos em doar elétrons (ensaios DPPH e poder redutor) e sequestrar íons ferrosos (Munteanu; Apetrei, 2021).

A FV é utilizada especialmente como ingrediente em rações animais, mas há alguns estudos que descrevem seu uso como substrato para a produção de

enzimas microbianas. Por exemplo, em cultivos do tipo SSF, a FV foi um substrato adequado para a produção de asparaginase por *Aspergillus niger* (Cunha *et al*., 2018). Contudo, a FV não foi apropriada para a obtenção de proteases de *Bacillus* sp. CL14 em cultivos do tipo SmF (Moraes *et al*., 2025).

Figura 2 – Concentração de proteínas solúveis, captura do radical DPPH, atividade quelante de Fe^{2+} e poder redutor em sobrenadantes de cultivos (Dias 0 e 4) de *Bacillus* sp. CL33A com farinha de vísceras (10 g/L).



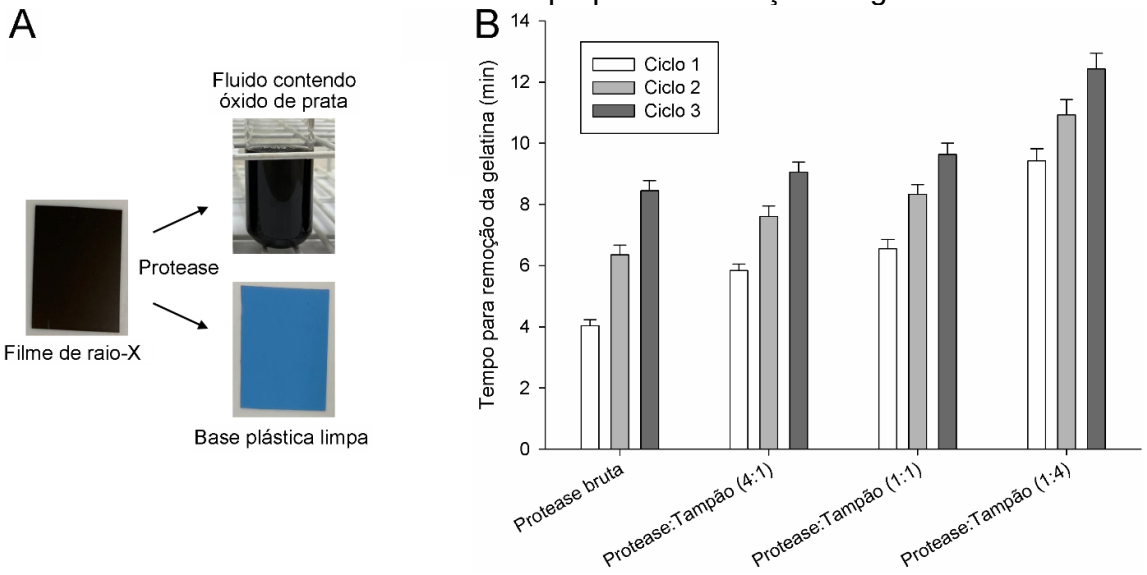
Avaliações da produção conjunta de proteases e hidrolisados bioativos são mais escassos. Pode ser citado, por exemplo, o uso de penas de frango (~90% de proteína) como substrato para cultivos com *Ochrobactrum intermedium* TG 3.48 (Menezes *et al*., 2023) e *Bacillus cereus* IIPK35 (Jana *et al*., 2022), e de subprodutos de pescado durante cultivos com *Bacillus licheniformis* B0009 (Rashid *et al*., 2024).

Os resultados obtidos (Figs. 1 e 2), juntamente com os estudos acima citados, indicam o caráter promissor do uso de substratos não convencionais (a FV no presente estudo) para processos microbianos. No cenário brasileiro, a indústria de reciclagem animal produz cerca de 700 mil toneladas de FV anualmente (ABRA, 2024). Neste sentido, a possibilidade de obter proteases e hidrolisados proteicos bioativos, de forma simultânea, representa uma oportunidade para aprimorar o custo-benefício dos processos microbianos e a agregação de valor a biomassas abundantes e de baixo custo (Lemes *et al*., 2022).

3.2 USO DA PROTEASE NA DEGELATINIZAÇÃO DE FILMES DE RAIO-X

A protease bruta de *Bacillus* sp. CL33A, coletada no 4º dia de cultivo, foi avaliada quanto à capacidade de remover a camada de gelatina-prata de filmes de raios-X. Os resultados são apresentados na Fig. 3. O tratamento com a protease bruta e suas diluições (4:1, 1:1, 1:4) foi efetivo para a remoção, resultando na base plástica limpa, que pode ser reutilizada, bem como no acúmulo de óxido de prata no meio reacional (Fig. 3A).

Figura 3 – Tratamento de filmes de raios-X com a protease bruta. (A) Esquema da remoção da camada de gelatina-prata. (B) Efeito da diluição da protease bruta e ciclos de reuso sobre o tempo para a remoção de gelatina.



Usando a protease bruta (sem diluição), o tempo necessário para a completa remoção da camada de gelatina-prata no Ciclo 1 foi de 4,03 min (Fig. 3B). Em comparação, foram necessários 8,70 min para a remoção nos controles positivos, onde utilizou-se solução de NaOH (1,5 M) a 55 °C. Observou-se redução de ~4,6% na massa dos filmes após os tratamentos com a enzima (ou NaOH), resultados que são similares aos descritos por Reddy *et al*. (2022) e Abdella; Ahmed (2025).

A diminuição da concentração de enzima, representada pelas diluições, aumentou o tempo de processamento, sendo necessários 9,41 min para a remoção com a maior diluição da enzima (1:4) no primeiro ciclo (Fig. 3B). Ou seja, uma menor quantidade inicial de enzima retarda o processo (Cavello *et al*., 2013).

Quanto ao reuso da enzima, os tempos necessários para a remoção com a protease bruta (sem diluição) foram de 6,35 min e 8,45 min no segundo e terceiro ciclos, respectivamente. Este comportamento também foi observado para as diluições da protease, sendo que, na maior diluição, o tempo para a retirada da gelatina no terceiro ciclo foi de 12,43 min (Fig. 3B). Este fenômeno pode indicar a desnaturação parcial da enzima a 55 °C, bem como efeitos negativos dos produtos da hidrólise (peptídeos da gelatina e a prata) sobre a enzima (Cavello *et al*., 2013).

Diversas proteases microbianas vêm sendo avaliadas para recuperar a prata de filmes de raios-X. Por exemplo, 60 min (50 °C) foram necessários para a protease bruta de *Bacillus licheniformis* MA1 remover a camada de gelatina de filmes de raio-X (Abdella; Ahmed, 2025), 30 min (50 °C) para uma protease bruta de *Bacillus subtilis* (Al-Abdalall; Al-Khaldi, 2016) e 6 min (60 °C) para a protease bruta de *Purpureocillium lilacinum* LPS # 876 (Cavello *et al*., 2013). No entanto, a remoção ocorreu somente após 24 h usando proteases brutas de *Bacillus licheniformis* MK937815 e *Acinetobacter pittii* MK691420 (Reddy *et al*., 2022).

Os resultados indicam que a protease de *Bacillus* sp. CL33A foi tão ou mais efetiva que outras enzimas já avaliadas. A protease foi mais eficiente do que o método químico comumente usado, reconhecido por gerar efluentes problemáticos. Assim, a remoção enzimática da prata representa uma alternativa mais sustentável

e econômica, de menor impacto ambiental, quando comparada aos métodos físicos e químicos usados na recuperação da prata (Bhavikatti *et al*., 2020).

3.3 PRODUÇÃO DE HIDROLISADOS ANTIOXIDANTES A PARTIR DE SUBPRODUTOS SUÍNOS

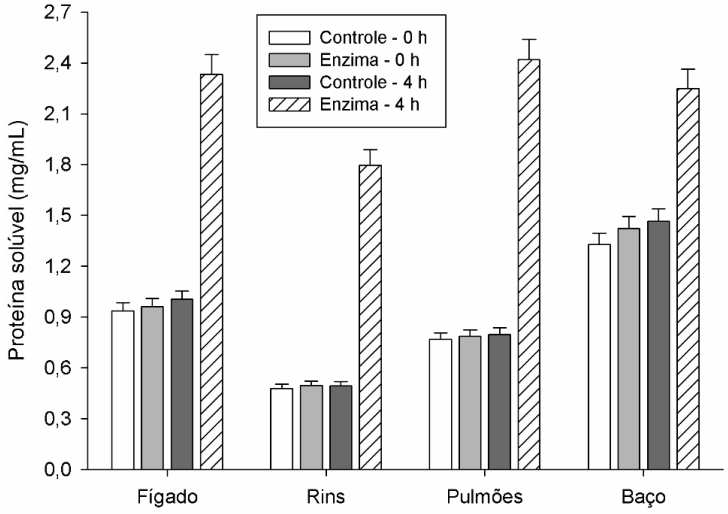
No 4º trimestre de 2024 foram abatidos 14,28 milhões de suínos no Brasil, totalizando 1,31 milhão de toneladas de carcaças. O estado do Rio Grande do Sul participou com 16,8% dos abates (3º no país) (IBGE, 2025). Abatedouros geram grandes quantidades de subprodutos, que podem chegar a 44% do peso vivo dos suínos (Martínez-Alvarez *et al*., 2015).

No contexto nacional, onde suínos são abatidos com 90-120 kg, cerca de 3% do peso vivo correspondem ao fígado, baço, rins e pulmões (Landgraf *et al*., 2006). Considerando esta porcentagem, e o abate de suínos no país (IBGE, 2025), pelo menos 150 mil toneladas destes órgãos foram geradas em abatedouros.

Estes órgãos são constituídos por água (~75,5%, m/m), proteínas (~18,3%, m/m), gorduras (~3,7%, m/m) e minerais (~2,5%, m/m) (Rivera *et al*., 2000; López-Martínez *et al*., 2023; Hwang *et al*., 2025). Em base seca, as proteínas representam 75-83% da massa destes órgãos. Apesar de serem comestíveis, o uso destes órgãos para fins alimentícios depende da cultura, da tradição e da religião, o que faz com que sejam considerados, majoritariamente, como subprodutos abundantes produzidos pelos abatedouros (Martínez-Alvarez *et al*., 2015).

Assim, fígado, baço, pulmões e rins suínos, foram avaliados como substratos para obter hidrolisados proteicos usando a protease bruta de *Bacillus* sp. CL33A. A protease foi capaz de hidrolisar os substratos, como indicado pela maior concentração de proteínas solúveis após 4 h de tratamento com a enzima ativa ($p < 0,05$) (Fig. 4). Não foram observados tais aumentos com a enzima inativa.

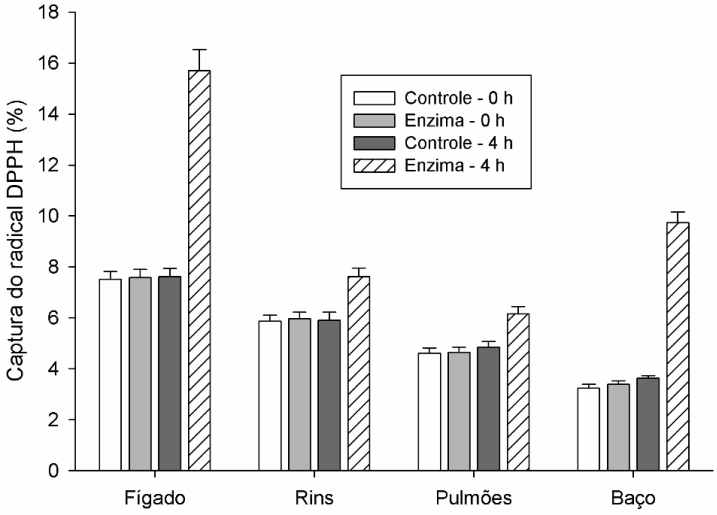
Figura 4 – Concentração de proteínas solúveis após o tratamento (0 e 4 h) de subprodutos suínos com a protease bruta inativa (Controle) ou ativa (Enzima).



A hidrólise de proteínas pode liberar peptídeos bioativos e, neste sentido, avaliou-se o potencial antioxidante dos hidrolisados obtidos. A hidrólise por 4 h exerceu efeito positivo ($p < 0,05$) sobre a capacidade de neutralização de radicais, quando comparada àquela dos subprodutos suínos não hidrolisados (Figs. 5 e 6).

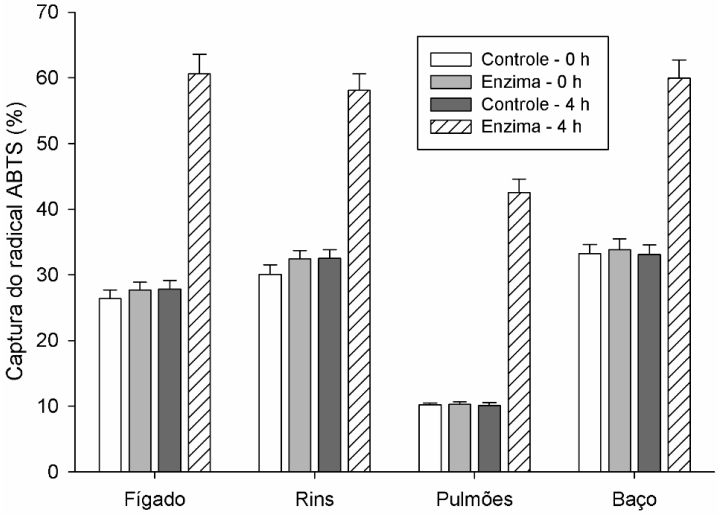
Nos ensaios realizados com o radical DPPH, a capacidade antioxidante de fígado foi incrementada de ~7,6% para 15,7%. Para rins, ocorreu aumento de ~5,9% para 7,6%; para pulmões, a captura de 4,7% foi elevada para 6,2%; e para baço, verificou-se aumento de 3,4% para 9,7% (Fig. 5).

Figura 5 – Captura do radical DPPH após o tratamento (0 e 4 h) de subprodutos suínos com a protease bruta inativa (Controle) ou ativa (Enzima).



A neutralização do radical ABTS pelos hidrolisados (4 h) de fígado, rins, pulmões e baço suínos atingiu 60,6%, 58,1%, 42,6% e 59,9%, respectivamente, que foram superiores ($p < 0,05$) aos percentuais de captura detectados nos órgãos não hidrolisados (27,3%, 31,7%, 10,2% e 33,4%) (Fig. 6).

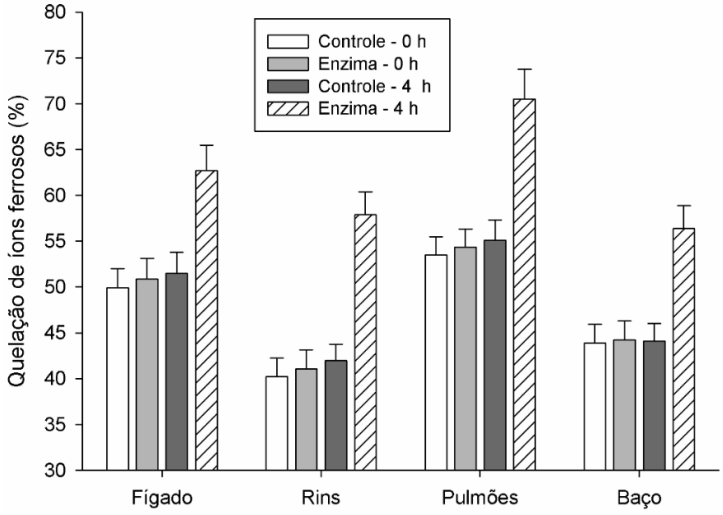
Figura 6 – Captura do radical ABTS após o tratamento (0 e 4 h) de subprodutos suínos com a protease bruta inativa (Controle) ou ativa (Enzima).



Os radicais ABTS e DPPH são neutralizados quando recebem elétrons. Assim, os resultados (Figs. 5 e 6) indicam que a hidrólise enzimática das proteínas contidas nos subprodutos ocasionou a liberação de peptídeos que possuem propriedades de transferência de elétrons (Munteanu; Apetrei, 2021).

Após 4 h de tratamento enzimático, os hidrolisados de fígado, rins, pulmões e baço exibiram capacidade de quelação de Fe^{2+} igual a 62,7%, 57,9%, 70,5% e 56,4%, respectivamente, que foram superiores ($p < 0,05$) àquelas dos subprodutos não hidrolisados (50,8%, 41,1%, 54,3% e 44,0%, respectivamente) (Fig. 7).

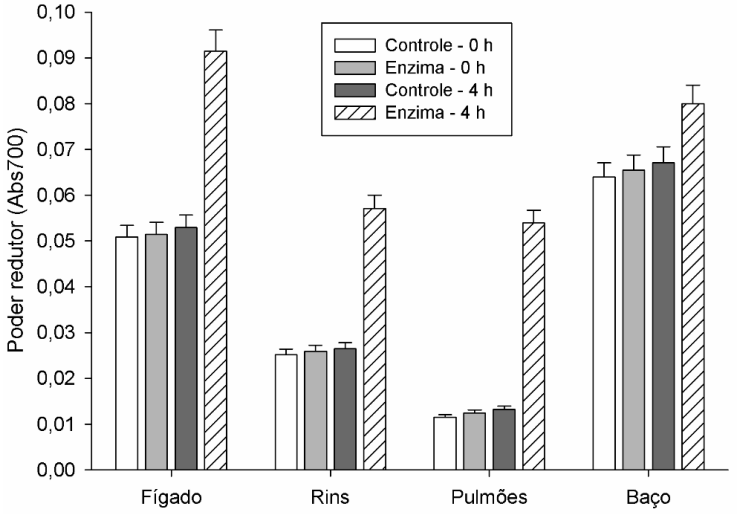
Figura 7 – Quelação de Fe^{2+} após o tratamento (0 e 4 h) de subprodutos suínos com a protease inativa (Controle) e com a protease bruta ativa (Enzima).



A capacidade de quelar íons ferrosos é considerada como importante propriedade antioxidante dos hidrolisados proteicos. Isso se deve ao fato destes íons serem considerados pró-oxidantes, catalisando a produção de radicais livres altamente reativos. Ou seja, a quelação de Fe^{2+} diminui a disponibilidade de íons que participariam da geração de radicais oxidativos prejudiciais (Zou *et al*., 2016).

O efeito benéfico da hidrólise dos subprodutos suínos também foi observado nos ensaios de poder redutor. Os valores mensurados nos hidrolisados de fígado (0,092 Abs700), rins (0,057 Abs700), pulmões (0,054 Abs700) e baço (0,080 Abs700) foram superiores ($p < 0,05$) aos obtidos com os órgãos não hidrolisados (0,051, 0,026, 0,012 e 0,065 Abs700) (Fig. 8).

Figura 8 – Poder redutor após o tratamento (0 e 4 h) de subprodutos suínos com a protease inativa (Controle) e com a protease bruta ativa (Enzima).



Estes ensaios, que mensuram a capacidade de conversão do ferro férrico (Fe^{3+}) a ferro ferroso (Fe^{2+}), são usados como indicadores da capacidade dos hidrolisados proteicos em reduzir intermediários oxidados, que podem participar de processos como a oxidação de lipídios (Munteanu; Apetrei, 2021).

Embora as hidrólises tenham elevado as capacidades antioxidantes dos subprodutos avaliados, os maiores incrementos médios, na comparação entre hidrolisados e substratos não hidrolisados para os quatro ensaios, foram observados para pulmões suínos, seguidos de fígado, rins e baço.

A produção de hidrolisados proteicos bioativos a partir de subprodutos suínos vem sendo investigada, majoritariamente usando proteases microbianas comerciais. Hidrolisados de fígados suínos com capacidade de neutralização de radicais, por exemplo, foram obtidos com Alcalase (de *Bacillus licheniformis*), Flavourzyme (de *Aspergillus oryzae*) (López-Pedrouso *et al*., 2022) e FoodPro PXT (de *Bacillus subtilis*) (Souza *et al*., 2025).

Especificamente, Verma *et al*. (2017) indicaram que fígados não hidrolisados (50 g/L) exibiram captura de radicais DPPH (23,2%) e ABTS (38,4%) que foi elevada para 39,5% (DPPH) e 68,4% (ABTS) após 4 h de hidrólise com a protease comercial Alcalase. Os hidrolisados também apresentaram capacidade superior de reduzir íons férricos em relação ao fígado não hidrolisado (Verma *et al*., 2017), embora tenha sido avaliada por método distinto ao usado no presente trabalho.

Além de fígado, a hidrólise de pulmões suínos com Alcalase e Protamex (de *Bacillus* sp.) incrementou a captura de radicais DPPH e ABTS, e a quelação de Fe^{2+} (Damgaard *et al*., 2014). Em estudo mais recente, a hidrólise com Alcalase também elevou, quando comparados aos controles não hidrolisados, as capacidades de captura de radicais DPPH e ABTS de fígado, pulmões, rins e baço suínos; no entanto, o poder redutor dos diferentes hidrolisados não foi afetado quando comparados aos dos órgãos não-hidrolisados (Hwang *et al*., 2025).

O uso de proteases microbianas não-comerciais para a obtenção de hidrolisados antioxidantes de subprodutos suínos é relativamente menos explorado. Neste sentido, uma protease de *Monascus purpureus* demonstrou habilidade para hidrolisar fígado suíno, e os hidrolisados apresentaram atividade antioxidante mensurada pela neutralização do radical DPPH, quelação de íons ferrosos e poder redutor (Yu *et al*., 2017).

Em outra investigação, hidrolisados de fígado e de baço de suínos (50 g/L) foram obtidos após 4 h de tratamento com a protease bruta de uma cepa de *Bacillus* sp. Os hidrolisados de fígado e baço demonstraram capacidade superior de captura do radical ABTS (72,1% e 78,3% *versus* 25,8% e 26,7% nos controles) e de quelação de Fe^{2+} (72,5% e 64,8% *versus* 59,3% e 48,9% nos controles) (Silva *et al*., 2025). A protease desta cepa também foi usada na hidrólise de pulmões e rins suínos (50 g/L; 4 h) (Hoffmann *et al*., 2024). Nos hidrolisados de pulmões, a captura de radicais DPPH (8,4%) e ABTS (54,5%), quelação de Fe^{2+} (64,2%) e poder redutor (0,060 Abs700) foram superiores a pulmões não hidrolisados (3,7%; 12,6%; 46,6%; 0,013 Abs700). A hidrólise de rins elevou a captura de DPPH (5,5%) e ABTS (73,6%), quelação de Fe^{2+} (78,3%) e poder redutor (0,116 Abs700), em comparação a rins não hidrolisados (1,9%; 19,2%; 69,5%; 0,030 Abs700) (Hoffmann *et al*., 2024).

A protease de *Bacillus* sp. CL33A já foi usada na produção de hidrolisados antioxidantes a partir de caseinato bovino e proteína isolada de soja (Kopplin *et al*.,

2024). No entanto, como as proteínas dos órgãos animais são diferentes (Rivera *et al*., 2000; Steen *et al*., 2016; Toldrá *et al*., 2019), os resultados obtidos apontam que a protease bruta da cepa CL33A é um biocatalisador versátil, e que o potencial de hidrolisar diversos substratos proteicos pode ser usado na valorização de subprodutos de abatedouros e frigoríficos.

4 CONCLUSÃO

A máxima produção de proteases extracelulares por *Bacillus* sp. CL33A ocorreu no 4º dia de cultivos submersos usando farinha de vísceras como substrato.

A concentração de proteínas solúveis e a atividade antioxidante dos sobrenadantes do 4º dia de cultivo foram superiores àquelas do início dos cultivos.

A protease bruta e suas diluições foram eficientes na degelatinização de filmes de raios-X, podendo ser reutilizadas, representando estratégia para a recuperação da prata e da base plástica dos filmes.

Fígado, rins, pulmões e baço suínos foram hidrolisados pela protease bruta, e a hidrólise elevou os potenciais antioxidantes destes subprodutos.

Os processos descritos podem ser úteis para valorizar biomassas animais e manejar filmes radiográficos, buscando contribuir para a performance econômica e ambiental do setor agroindustrial e de serviços de saúde.

REFERÊNCIAS

ABDELLA, M. A. A.; AHMED, S. A. Stable protease from *Bacillus licheniformis*-MA1 strain: statistical production optimization, kinetic and thermodynamic characterization, and application in silver recovery from used X-ray films. **Microbial Cell Factories**, v. 24, artigo 98, 2025.

ABRA (Associação Brasileira de Reciclagem Animal). **Anuário ABRA 2023**. Brasília: ABRA, 2024.

AL-ABDALALL, A. H.; AL-KHALDI, E. M. Recovery of silver from used X-ray film using alkaline protease from *Bacillus subtilis* sub sp. *subtilis*. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, p. 1413–1416, 2016.

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

AZAMBUJA, A. M. *et al*. Enzimólise de subprodutos de origem animal para a produção de hidrolisados proteicos antioxidantes. *In*: XV JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA UFFS, 2025, Chapecó. **Anais [...]**. Chapecó: UFFS, 2025. 5 pp.

BASTOS, B. G. *et al*. Bioeconomia, economia circular e agroindústria 4.0: proposições para as transições tecnológicas emergentes. **Colóquio – Revista do Desenvolvimento Regional**, v. 19, p. 312–338, 2022.

BHAVIKATTI, J. S. *et al*. Statistical optimisation of protease production using a freshwater bacterium *Chryseobacterium cucumeris* SARJS-2 for multiple industrial applications. **3 Biotech**, v. 10, Artigo 279, 2020.

BOBOUA, S. Y. B. *et al*. Valorization of animal waste proteins for agricultural, food production, and medicinal applications. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 8, Artigo 1366333, 2024.

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.

BOSE, A. *et al*. Keratinolytic protease production by *Bacillus amyloliquefaciens* 6B using feather meal as substrate and application of feather hydrolysate as organic nitrogen input for agricultural soil. **Waste and Biomass Valorization**, v. 5, p. 595–605, 2014.

BRAND-WILLIAMS, W. *et al*. 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**, v. 64, p. 4714–4745, 2024.

CAVELLO, I. A. *et al*. Enzymatic hydrolysis of gelatin layers of X-ray films and release of silver particles using keratinolytic serine proteases from *Purpureocillium lilacinum* LPS #876. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 1133–1139, 2013.

CHANG, C. Y. *et al*. Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1537–1543, 2007.

CUNHA, M. C. *et al*. Using response surface methodology to improve the L-asparaginase production by *Aspergillus niger* under solid-state fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 31–36, 2018.

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

HOFFMANN, R. G. *et al*. Enzymatic processing of animal by-products: production of antioxidant hydrolysates with *Bacillus* sp. CL18 crude protease. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 31, p. 26737–26746, 2024.

HWANG, J. *et al*. Comparative exploration of antioxidant properties of Alcalase and trypsin-hydrolyzed porcine by-products and their classification for industrial use. **Applied Sciences**, v. 15, artigo 47, 2025.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Indicadores IBGE: Estatística da Produção Pecuária (out.-dez. 2024)**. Brasília: IBGE, 2025.

JANA, A. *et al*. Efficient valorization of feather waste by *Bacillus cereus* IIPK35 for concomitant production of antioxidant keratin hydrolysate and milk-clotting metallo-serine keratinase. **Journal of Environmental Management**, v. 324, artigo 116380, 2022.

KOPPLIN, B. W. *et al*. Production of antioxidant hydrolysates from bovine caseinate and soy protein using three non-commercial bacterial proteases. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 42, p. 826–834, 2024.

LANDGRAF, S. *et al*. Developments of carcass cuts, organs, body tissues and chemical body composition during growth of pigs. **Animal Science**, v. 82, p. 889–899, 2006.

LEMES, A. C. *et al*. Biological approaches for extraction of bioactive compounds from agroindustrial by-products: a review. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, Artigo 802543, 2022.

LÓPEZ-MARTÍNEZ, M. I. *et al*. Pork organs as a potential source of flavour-related substances. **Food Research International**, v. 173, artigo 113468, 2023.

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.

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

MARTÍ-QUIJAL, F. J. *et al*. Obtaining antioxidants and natural preservatives from food by-products through fermentation: a review. **Fermentation**, v. 7, artigo 106, 2021.

MARTÍNEZ-ALVAREZ, O. *et al*. 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.

MENEZES, C. L. A. *et al*. The degradation of chicken feathers by *Ochrobactrum intermedium* results in antioxidant and metal chelating hydrolysates and proteolytic enzymes for staphylococcal biofilm dispersion. **3 Biotech**, v. 13, artigo 202, 2023.

MORAES G. P. *et al*. Production and applications of *Bacillus* sp. CL14 crude protease: approaches for biomass valorization and silver recovery. **Systems Microbiology and Biomanufacturing**, 2025. No prelo.

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

OLIVEIRA, C. T. *et al*. Catalytic properties and thermal stability of a crude protease from the keratinolytic *Bacillus* sp. CL33A. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 10, p. 270–277, 2017.

PEREIRA, A. S. *et al*. From agri-food wastes to enzyme production: a systematic review with *Methodi Ordinatio*. **Waste and Biomass Valorization**, v. 15, p. 5843–5870, 2024.

RASHID, N. Y. A. *et al*. Valorization of Malaysian fish sausage (Keropok Lekor) by-products into bioactive fish protein hydrolysate by *Bacillus licheniformis* fermentation: influence of by-products characteristics on nutritional, antioxidant, and antibacterial capacities. **Waste and Biomass Valorization**, v. 15, p. 3169–3185, 2024.

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

REDDY, N. *et al*. Production, characterization and applications of proteases produced by *Bacillus licheniformis*, *Acinetobacter pittii* and *Aspergillus niger* using neem seed oil cake as the substrate. **Industrial Crops and Products**, v. 187, artigo 115403, 2022.

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.

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.

SILVA, C. B. *et al*. Production of bacterial protease via solid-state cultivation with agro-industrial by-products and eco-friendly perspectives of enzyme application. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 27, p. 2029–2042, 2025.

SILVER INSTITUTE. **World Silver Survey**. Washington: Silver Institute and Metals Focus, 2024.

SONG, P. *et al*. Microbial proteases and their applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, Artigo 1236368, 2023.

SOUZA, H. K. S. *et al*. A detailed characterization of porcine liver protein hydrolysate. **Food Bioscience**, v. 63, artigo 105795, 2025.

STEEN, L. *et al*. Functional properties of pork liver protein fractions. **Food and Bioprocess Technology**, v. 9, p. 970–980, 2016.

TANEJA, A. *et al*. Value addition employing waste bio-materials in environmental remedies and food sector. **Metabolites**, v. 13, artigo 624, 2023.

TOLDRÁ, M. *et al*. Recovery and extraction of technofunctional proteins from porcine spleen using response surface methodology. **Food and Bioprocess Technology**, v. 12, p. 298–312, 2019.

VERMA, A. K. *et al*. Antioxidant and antimicrobial activity of protein hydrolysate extracted from porcine liver. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 87, p. 711–717, 2017.

WANG, S. *et al*. Improving slaughterhouse byproducts utilization via anaerobic digestion, composting, and rendering. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 189, artigo 113881, 2024.

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.

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

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