



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Nely de Almeida Pedrosa

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS À PARTIR DA HIDRÓLISE  
ENZIMÁTICA DA QUERATINA ASSOCIADA COM ULTRASSOM E MICRO-ONDAS

FLORIANÓPOLIS - SC  
2020

Nely de Almeida Pedrosa

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS À PARTIR DA HIDRÓLISE  
ENZIMÁTICA DA QUERATINA ASSOCIADA COM ULTRASSOM E MICRO-ONDAS

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Alcilene Rodrigues M. Fritz, Dra

Coorientador: Prof. José Carlos Cunha Petrus, Dr.

FLORIANÓPOLIS - SC  
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Pedrosa, Nely de Almeida

Produção e caracterização de peptídeos à partir da hidrólise enzimática da queratina associada com ultrassom e micro ondas / Nely de Almeida Pedrosa ; orientadora, Alcilene Rodrigues Monteiro Fritz, coorientador, José Carlos Cunha Petrus, 2020.

114 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. Bioprocessos. 3. Indústria Química e de Alimentos. 4. Desenvolvimento de processos e produtos. I. Fritz, Alcilene Rodrigues Monteiro. II. Petrus, José Carlos Cunha . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Nely de Almeida Pedrosa

**Produção e caracterização de peptídeos à partir da hidrólise enzimática da queratina associada com ultrassom e micro-ondas**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof<sup>a</sup>. Jaciane Lutz Ienczak, Dr<sup>a</sup>.

PPGEAL / UFSC

Prof. Cristiano José de Andrade, Dr.

PósEnq / UFSC

Prof<sup>a</sup>. Helen Treichel, Dr<sup>a</sup>.

PPGCTA / UFSS

Certificamos que esta é a **versão original final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Engenharia de Alimentos.

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof<sup>a</sup>. Alcilene Rodrigues M. Fritz, Dra  
Orientadora

Florianópolis, 2020

*Dedico esta tese à minha querida mãe  
Susana Helena (in memoriam),  
por seu exemplo de dedicação e alegria,  
minha eterna incentivadora  
que me ilumina lá do céu.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por me permitir ter força e determinação.

Aos meus pais Ioman e Susana por me concederem a vida, educação e valores.

À minha família pelo amor da infância ao presente. Especialmente às minhas irmãs Nádia e Ludmila, que desde as brincadeiras de escolinha me ensinaram e foram exemplo mesmo antes da escola. E que me deram meus lindos sobrinhos que tanto amo.

À Universidade Federal da Paraíba pela oportunidade de estudo, trabalho e ascensão profissional, em especial à toda a equipe brilhante do Departamento de Tecnologia de Alimentos, exemplo de profissionalismo e dedicação ao ensino, pesquisa e extensão.

À UFSC e toda equipe do PPGEAL, técnicos-administrativos, professores e serviços terceirizados de manutenção.

À professora Alcilene Fritz pela orientação, confiança, dedicação às correções e por estar sempre disponível.

Ao Professor José Carlos Cunha Petrus pela orientação, contribuições e compartilhamento de experiência. Um exemplo de professor com amor à profissão.

Aos professores examinadores por disponibilizarem seu tempo e pelas valiosas contribuições.

À todos com quem partilhei momentos e conhecimentos no LABSEM. Foram anos de ótima convivência. Levarei as boas lembranças e a amizade construída.

Aos alunos e técnicos do LINDEN, LATESC, PROFI, Central de análises e LCP pelos equipamentos disponibilizados e realização de análises.

À Aline, Danielle, Ingrid e todos os amigos do Nordeste e de Minas Gerais que aqui fiz. Compartilhar o entusiasmo, humor, calor humano, cultura e alegria me fizeram sentir em casa, vocês foram minha família no Sul e são amigos para a vida.

Ao Toni por todo amor, compreensão e companhia durante horas a fio sentados à mesa de trabalho.

Aos meus amigos e família, Socorro, Susana, Jailson, Jolando, Neila, Rose, Sérgio, Carmo, Bernadete e Rachel que mesmo de longe me incentivaram e elogiaram minha dedicação aos estudos.

À empresa Frangos Morgana que cedeu gentilmente as penas de frango desta pesquisa.

PEDROSA, N. A. P. *Produção e caracterização de peptídeos à partir da hidrólise enzimática da queratina associada com ultrassom e micro-ondas*. Florianópolis, 2020. 114 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina.

## RESUMO

As penas de frango são recursos biológicos abundantes. Cerca de um milhão de toneladas de penas são geradas anualmente no Brasil pela indústria de processamento de frango. Utilizadas principalmente na forma de farinha para ração animal, as penas poderiam ser melhor aproveitadas para outros fins, como cosméticos, filmes, fibras, hidrogéis, material biomédico, micro e nanopartículas para fins alimentícios devido seu alto teor proteico, superior a 75 % de proteína bruta, das quais a queratina é a proteína majoritária (90 %). Face ao exposto, a presente pesquisa propôs a obtenção e caracterização de hidrolisado de queratina de penas de frango com aplicação de tecnologias de ultrassom e micro-ondas como adjuvantes do processo. Em etapa inicial de dissolução química das penas (em solução de hidróxido de sódio 0,08 M) foi executado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)  $2^3$ , tendo como variável dependente o grau de hidrólise, obtendo-se a melhor condição de dissolução para as variáveis independentes (4 % de penas, 0,06 M de sulfito de sódio e temperatura de 70 °C), por 8 h. A etapa seguinte de hidrólise enzimática foi realizada durante 10 h em pH 10,6, utilizando a enzima proteolítica savinase<sup>®</sup>. A partir de um DCCR  $2^2$  foi definida a melhor condição de hidrólise a temperatura de 50 °C e concentração de enzima/substrato de 12,5 %. Estabelecidas as condições de dissolução química e hidrólise enzimática, o ultrassom e as micro-ondas foram aplicados nas penas dissolvidas como pré-tratamento da hidrólise enzimática. O efeito do ultrassom foi significativo na enzimólise da queratina e nas propriedades do hidrolisado em comparação com a enzimólise tradicional e a associada às micro-ondas. O hidrolisado de queratina obtido possui propriedades tecnológicas e bioativas, bem como destacável qualidade nutricional. É composto por 75,78 % de proteína (bs), contém peptídeos de baixa massa molecular (< 1000 Da), possui alta solubilidade (> 80 %) e digestibilidade proteica (89,28 %), capacidade emulsificante, atividade antioxidante ( $IC_{50} = 3,67 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  frente ao DPPH<sup>•+</sup> e  $1,35 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  frente ao ABTS<sup>•+</sup>), partículas de tamanho menor que 300 nm passíveis de fácil absorção intestinal, cutânea e capilar. A associação de tecnologias alternativas como o ultrassom pode ser utilizada para transformar subprodutos da agroindústria, tal como penas de frango, em hidrolisados de queratina, com potencial para aplicação em cosméticos, suplementação nutricional animal e humana, insumos para agricultura e indústria alimentícia.

**Palavras-chave:** Enzima. Hidrolisado. Pena. Proteína. Tecnologia emergente.

PEDROSA, N. A. P. *Production and characterization of peptides from keratin enzymatic hydrolysis associated with ultrasound and microwave*. Florianópolis, 2020. 114 p. Thesis (Doctoral degree in Food Engineering), Federal University of Santa Catarina.

## ABSTRACT

Chicken feathers are abundant biological resources. Close to one million tons of feathers are generated annually in Brazil from chicken processing industry. The feathers are used mainly for animal feed feather meal, however, due to their high protein content, greater than 75 % crude protein, which keratin is the major protein (90 %) could be applied for others purposes such as food industry, cosmetics, films, fibers, hydrogels and biomedical material. Thus, this research proposed to obtain and characterize keratin hydrolyzate from chicken feathers using ultrasound and microwave technologies as process adjuvants. In initial step of feathers chemical dissolution (sodium hydroxide solution at 0.08 M), a Central Composite Rotational Design (CCRD)  $2^3$  was performed, with the degree of hydrolysis as the dependent variable, obtaining the best dissolution condition for the independent variables (4% of feathers, 0.06 M sodium sulfite and 70 °C), for 8 h. Then the enzymatic hydrolysis step carried out at pH 10.6, for 10 h, using the proteolytic enzyme savinase<sup>®</sup>. A central rotational composite design  $2^2$  generated the best hydrolysis condition: at 50 °C and 12.5 % enzyme/substrate concentration. Once the conditions for chemical dissolution and enzymatic hydrolysis were established, ultrasound and microwaves were applied to dissolved feathers as enzymatic hydrolysis pre-treatment. The effect of ultrasound was significant on keratin enzymolysis and hydrolyzate properties compared to traditional enzymolysis and microwave-associated enzymolysis. The results obtained in this research showed that keratin hydrolysate has technological and bioactive properties, as well as outstanding nutritional quality. It's composed by 75.78 % protein (db), peptides of low molecular mass (<1000 Da). It has high solubility (> 80 %) and protein digestibility (89.28 %), emulsifying capacity, antioxidant activity (IC<sub>50</sub> = 3.67 mg · mL<sup>-1</sup> in front of DPPH ·<sup>+</sup> and 1.35 mg · mL<sup>-1</sup> in front of ABTS ·<sup>+</sup>) and particles size smaller than 300 nm, important for intestinal, cutaneous and capillary absorption. The association of alternative technologies such as ultrasound can be used to transform by-products of the agribusiness, such as chicken feathers, into keratin hydrolysates, with potential for application in cosmetics, animal and human nutritional supplementation, for agriculture field and for food industry.

**Keywords:** Emergent technology. Enzyme. Feather. Hydrolysate. Protein.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AAO	Atividade antioxidante
ABTS	2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina) 6-ácido sulfônico
ACE	Enzima conversora de angiotensina
ANOVA	Análise de variância
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
CE	Capacidade emulsificante
Da	Daltons
DCCR	Delineamento composto central rotacional
DOE	Design de experimentos
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
E/S	Concentração enzima/substrato
EE	Estabilidade da emulsão
EZ	Enzimático
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
GAE	Ácido gálico
GH	Grau de hidrólise
g	Gramas
h	Hora
HIUS	Ultrassom de alta intensidade
Hz	Hertz
kg	Quilograma
M	Molar
MW	Micro-ondas
NA	Nitrogênio $\alpha$ -amino
NT	Nitrogênio total
OPA	<i>o</i> -ftaldialdeído
Pa	Pascoal
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto isoelétrico
t	Tonelada
T	Temperatura

TNBS	Trinitrobenzenossulfônico
US	Ultrassom
W	Watts

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura de uma pena.....	23
Figura 2 - Estrutura pregueada da $\beta$ -queratina. (a) modelo bola-e-bastão; folha pregueada ...	24
Figura 3 - Fluxograma de obtenção do hidrolisado de queratina de penas de frango. ....	40
Figura 4 - Dissolução química das penas em sistema de reatores encamisados.....	42
Figura 5 - Pré-tratamento da solução de pena de frango em sonicador ultrassônico. ....	46
Figura 6 - Atividade enzimática da Savinase <sup>®</sup> em pH 8,6; 9,6 e 10,6.....	56
Figura 7 - Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis de processo no grau de hidrólise (GH) em 12 h de dissolução das penas de frango.....	59
Figura 8 - Superfícies de resposta para o grau de hidrólise em função da temperatura e da concentração de substrato para os tempos de 2h, 4h, 6h, 8h, 10h e 12h de dissolução. .	60
Figura 9 - Superfícies de resposta para o grau de hidrólise em função da temperatura e da concentração de Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> durante 2h, 4h, 6h, 8h, 10h e 12h de dissolução. ....	62
Figura 10 - Evolução da dissolução das penas ao longo do tempo. ....	63
Figura 11 - Superfície de resposta e curvas de contorno do grau de hidrólise em função da concentração enzima/substrato e da temperatura em 10h de enzimólise.....	66
Figura 12 - Efeitos das variáveis no grau de hidrólise (GH) da queratina de penas de frango em 8h de processo. ....	69
Figura 13 - Superfície de resposta do grau de hidrólise (GH) em função da potência e do tempo de aplicação do ultrassom. ....	70
Figura 14 - Ensaio enzimáticos sem pré-tratamento (EZ- média de pontos centrais: E/S = 12,5%; T = 50 °C) e com pré-tratamento por ultrassom (US - 442 W; 12,5 m).....	71
Figura 15 - Comportamento das variáveis temperatura (°C) x potência (W) x tempo (min) durante o pré-tratamento em reator de micro-ondas. ....	73
Figura 16 - Grau de hidrólise (GH) ao longo da enzimólise dos três tratamentos EZ, US, MW. ....	74
Figura 17 - Hidrolisado de queratina de penas de frango antes e após microfiltração.....	75
Figura 18 - Espectro de massa (HILIC - ESI - QTOF - MS) do hidrolisado enzimático de queratina de penas de frango.....	78
Figura 19 - Espectro de massa (HILIC - ESI - QTOF - MS) do hidrolisado enzimático de queratina submetido à pré-tratamento com ultrassom. ....	78

Figura 20 - Espectro de massa (HILIC - ESI - QTOF - MS) do hidrolisado enzimático de queratina submetido à pré-tratamento com micro-ondas .....	79
Figura 21 - Porcentagem de atividade antioxidante (% AAO) e IC <sub>50</sub> das amostras e do padrão ácido gálico (GAE), frente ao radical DPPH <sup>•+</sup> .....	84
Figura 22 - Porcentagem de atividade antioxidante (% AAO) e IC <sub>50</sub> das amostras e do padrão ácido gálico (GAE), frente ao radical ABTS <sup>•+</sup> .....	86
Figura 23 - Atividade antioxidante do hidrolisado de queratina de penas de frango para os radicais ABTS <sup>•+</sup> e DPPH <sup>•+</sup> .....	87
Figura 24 - Comparativo da distribuição do tamanho de partículas do solubilizado sem e com tratamento com ultrassom. ....	88
Figura 25 - Comparativo do tamanho médio de partículas dos três hidrolisados (EZ, US e MW).....	90
Figura 26 - Espectros FTIR-ATR das penas e hidrolisados (EZ, US e MW). A – Espectro total; B – Zoom na faixa 1400 a 800 cm <sup>-1</sup> .....	91
Figura 27 - Separação e composição das fases 24h após emulsificação óleo de soja – hidrolisado de queratina .....	95
Figura 28 - Estabilidade da emulsão (%) para os três hidrolisados EZ, US e MW.....	96
Figura 29 - Viscosidade – $\eta$ - (mPa · s) do hidrolisado de queratina de penas de frango frente à taxa de cisalhamento – $\dot{\gamma}$ - (1/s) e tensão de cisalhamento - $\tau$ - (Pa).....	98
Figura 30 - Hidrolisado final de queratina de penas de frango. ....	99
Figura 31 - Espectro de absorção da luz visível dos hidrolisados EZ, US e MW.....	99
Figura 32 - Possibilidades de aplicação do hidrolisado de queratina de penas de frango. ....	101

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Propriedades bioativas e funcionais de hidrolisados de diferentes subprodutos do frango.....	30
Quadro 2 - Estudos da hidrólise de proteínas, produção de peptídeos bioativos e uso de novas tecnologias de tratamento. ....	35
Quadro 3 - Parâmetros da hidrólise enzimática: concentração de substrato, tempo, pH, concentração de enzima e temperatura.....	44
Quadro 4 - Propriedades nutricionais, bioativas, estruturais, funcionais, físico-químicas e sensoriais do hidrolisado. ....	49
Quadro 5 - Evolução da dissolução ao longo do tempo. ....	64
Quadro 6 - Características do hidrolisado de queratina de penas de frango.....	100

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Planejamento fatorial $2^3$ para avaliar os efeitos das variáveis concentração de substrato, temperatura e concentração de Sulfito de Sódio na dissolução das penas...43	43
Tabela 2 - Planejamento fatorial $2^2$ para avaliar os efeitos das variáveis relação enzima/substrato e temperatura na hidrólise enzimática da queratina de penas de frango com savinase®.....44	44
Tabela 3 - Planejamento fatorial $2^2$ para os pré-tratamentos com ultrassom e micro-ondas nas soluções de penas dissolvidas.....46	46
Tabela 4 - Composição centesimal (média e desvio padrão) das penas de frango limpas e secas.....55	55
Tabela 5 - Grau de hidrólise ao longo do tempo de dissolução das penas de frango.....58	58
Tabela 6 - Análise de variância (ANOVA) do planejamento experimental para validação do modelo matemático empírico que descreve o grau de hidrólise em 12 h de dissolução das penas.....59	59
Tabela 7 - Grau de hidrólise da queratina de penas de frango durante processo com enzima savinase®.....65	65
Tabela 8 - Análise de variância (ANOVA) do planejamento experimental para validação do modelo matemático empírico do grau de hidrólise em 10 h de hidrólise enzimática...66	66
Tabela 9 - Grau de hidrólise durante etapa enzimática para amostras com pré-tratamento com ultrassom.....68	68
Tabela 10 - Análise de variância (ANOVA) do planejamento experimental para validação do modelo matemático empírico do grau de hidrólise enzimática, após tratamento com ultrassom.....69	69
Tabela 11 - Grau de hidrólise da queratina de penas de frango pré-tratadas em micro-ondas durante a enzimólise.....72	72
Tabela 12 - Teor de proteína total dos hidrolisados finais: EZ (enzimático), US (ultrassom) e MW (micro-ondas).....76	76
Tabela 13 - Composição centesimal média do hidrolisado de queratina.....76	76
Tabela 14 - Resumo dos peptídeos identificados nos hidrolisados de queratina pela análise HILIC - ESI - QTOF - MS.....80	80
Tabela 15 - Digestibilidade proteica <i>in vitro</i> dos hidrolisados de queratina de penas de frango.....81	81

Tabela 16 - Dados da análise de tamanho de partículas do solubilizado (controle) e solubilizado com tratamento de ultrassom (SL-US).....	88
Tabela 17 - Dados da análise de tamanho de partículas dos hidrolisados (EZ, US e MW).....	89
Tabela 18 - Proteína solúvel dos hidrolisados de queratina de penas de frango (EZ, US e MW) em diferentes pH's.....	92
Tabela 19 - Solubilidade proteica dos hidrolisados de queratina de penas de frango (EZ, UZ e MW).....	93
Tabela 20 - Capacidade emulsificante dos hidrolisados de queratina de penas de frango (EZ, US, MW).....	94

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>2 OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>21</b>
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>22</b>
3.1 PENAS DE FRANGO.....	22
3.1.1 Composição das penas de frango .....	22
3.1.2 Utilização da queratina de penas de frango.....	25
3.2 HIDROLISADOS PROTEICOS .....	26
3.2.1 Hidrólise enzimática da queratina .....	26
3.2.2 Utilização de proteínas hidrolisadas e seus benefícios à saúde.....	28
3.2.3 Propriedades funcionais das proteínas hidrolisadas .....	31
3.2.4 Grau de hidrólise de proteínas.....	31
3.3 TECNOLOGIAS DE ULTRASSOM E MICRO-ONDAS NA HIDRÓLISE DE PROTEÍNAS .....	32
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>39</b>
4.1 MATÉRIA-PRIMA .....	39
4.2 ENZIMA E ATIVIDADE ENZIMÁTICA .....	39
4.3 PROCESSAMENTO DAS PENAS E OBTENÇÃO DO HIDROLISADO.....	40
4.3.1 Preparo da amostra .....	41
4.3.2 Dissolução química das penas.....	41
4.3.3 Hidrólise enzimática.....	43
4.3.4 Pré-tratamento enzimático: aplicação das tecnologias de ultrassom e micro-ondas	45
4.3.5 Filtração dos hidrolisados com membrana.....	47
4.4 ACOMPANHAMENTO DO PROCESSO DE HIDRÓLISE E CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROLISADOS.....	47

4.4.1 Grau de hidrólise (GH).....	47
4.4.2 Caracterização do hidrolisado de queratina de penas de frango .....	49
4.4.2.1 Quantificação de proteína, umidade, cinzas e nutrientes em base seca.....	49
4.4.2.2 Perfil peptídico .....	50
4.4.2.3 Digestibilidade <i>in vitro</i> das proteínas .....	50
4.4.2.4 Atividade antioxidante.....	50
4.4.2.5 Propriedades estruturais.....	52
4.4.2.6 Solubilidade proteica (SP).....	52
4.4.2.7 Capacidade emulsificante (CE) .....	53
4.4.2.8 Estabilidade da emulsão (EE).....	53
4.4.2.9 pH .....	54
4.4.2.10 Densidade .....	54
4.4.2.11 Viscosidade.....	54
4.4.2.12 Índice de refração .....	54
4.4.2.14 Cor .....	54
4.4.3 Análise estatística.....	55
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>55</b>
5.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DAS PENAS .....	55
5.2 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA SAVINASE <sup>®</sup> .....	56
5.3 DISSOLUÇÃO DAS PENAS .....	57
5.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA .....	64
5.5 TRATAMENTO COM ULTRASSOM .....	67
5.6 TRATAMENTO COM MICRO-ONDAS .....	72
5.7 ANÁLISES DO HIDROLISADO DE QUERATINA DE PENAS DE FRANGO .....	75
5.7.1 Quantificação de proteína e composição centesimal.....	75
5.7.2 Perfil peptídico .....	77
5.7.3 Digestibilidade <i>in vitro</i> .....	81
5.7.4 Atividade antioxidante .....	83
5.7.5 Propriedades estruturais .....	87
5.7.6 Solubilidade proteica (SP).....	92

5.7.7 Capacidade emulsificante (CE).....	93
5.7.8 Estabilidade da emulsão (EE) .....	95
5.7.9 Densidade, viscosidade e índice de refração .....	97
5.7.10 Cor do hidrolisado de queratina de penas de frango .....	98
5.8 RESUMO DE PROPRIEDADES E APLICAÇÕES DO HIDROLISADO DE QUERATINA DE PENAS DE FRANGO .....	100
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>102</b>
<b>7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>103</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>104</b>

## DIAGRAMA CONCEITUAL

<b>PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS À PARTIR DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA QUERATINA ASSOCIADA COM ULTRASSOM E MICRO-ONDAS</b>
<b>Por quê?</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Derivados de proteínas com alto valor biológico e utilidade tecnológica têm se tornado essenciais para a população e como meio de valorização de resíduos;</li> <li>• O Brasil é o 2º maior produtor mundial de carne de frango, gera 1 milhão de toneladas de penas de frango anualmente, que são prejudiciais ao meio ambiente, quando descartadas inapropriadamente;</li> <li>• As penas têm um alto teor de proteínas (<math>\geq 75\%</math>), das quais mais de 90% é queratina;</li> <li>• A queratina das penas pode ser extraída, hidrolisada e utilizada como componente importante para a produção de produtos com alto valor agregado;</li> <li>• A aplicação de técnicas alternativas para reduzir o uso de produtos químicos, o tempo e a temperatura de processo de extração e hidrólise da queratina de penas, é importante para gerar aminoácidos ou peptídeos de alto valor biológico para aplicação em alimentos e outros produtos.</li> </ul>
<b>O que já foi feito?</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pesquisas usando ultrassom e/ou micro-ondas como pré-tratamento da hidrólise enzimática de proteínas de concentrado proteico de leite, da clara de ovo e de proteína de soja;</li> <li>• Existe pesquisa com produção de nanopartículas a partir de penas de frango por hidrólise enzimática, seguida de tratamento ultrassônico para avaliação de tamanho de partículas.</li> </ul>
<b>Hipóteses</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Otimizar o processo de hidrólise enzimática de queratina de penas de frango aplicando tecnologias de ultrassom e micro-ondas;</li> <li>• Obter hidrolisados de queratina extraída de penas de frango com propriedades tecnológicas, qualidade nutricional e/ou funcional.</li> </ul>
<b>Metodologia experimental</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Limpeza, secagem e moagem das penas;</li> <li>• Extração e hidrólise da queratina de penas de frango em reatores com controle de temperatura e pH;</li> <li>• Montagem e execução de planejamentos experimentais para definir as melhores condições de extração e hidrólise da queratina com e sem aplicação de ultrassom e de micro-ondas;</li> <li>• Caracterização do hidrolisado quanto as suas propriedades nutricionais, bioativas, estruturais e funcionais.</li> </ul>
<b>Respostas</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Metodologia de extração sustentável e hidrólise da queratina de penas de frango inovadora;</li> <li>• Hidrolisado com qualidade nutricional e tecnológica, com interesse industrial.</li> </ul>

## 1 INTRODUÇÃO

Em 2018 a produção brasileira de carne de frango ultrapassou 12,8 milhões de toneladas, consolidando o Brasil como segundo maior produtor mundial. Considerando que cerca de 7 % do peso corporal dos frangos são penas, por ano no país há uma produção de cerca de 1 milhão de toneladas de penas. Um matadouro com uma capacidade de abate de 50.000 aves pode produzir três toneladas de penas secas por dia. O descarte descontrolado desse resíduo é ambientalmente inaceitável. Além disso, a queima de penas em instalações especiais é economicamente ineficaz e a sua transformação em farinha de penas, processo muito usado, resulta em alimentos de baixa qualidade nutricional para alimentação animal (ONIFADE et al., 1998; GUPTA et al., 2012; ABPA, 2019).

As penas de frango são recursos biológicos com alto teor proteico, superior a 75 % de proteína bruta. Em alternativa à produção de farinha de penas, a queratina, proteína majoritária nas penas de frango, pode ser extraída e utilizada como componente importante para a produção de produtos de maior valor agregado. A gestão desta biomassa de resíduos por reconversão em produtos comerciais pode não só proteger o ecossistema de grande quantidade de dejetos, mas também impulsionar economicamente a indústria alimentícia, farmacêutica e de cosméticos. Entretanto, há uma necessidade de utilização de métodos ambientalmente mais limpos para a extração da queratina, que minimizem o uso de reagentes químicos evitando agressão ao meio ambiente (GUPTA, SHARMA, 2016).

Devido ao aumento crescente da população mundial, fontes não tradicionais de proteínas para a alimentação humana precisam ser encontradas e avaliadas para atender as demandas futuras. No entanto, a adequação dessas novas fontes de proteínas para uso em alimentos depende de seu custo e de sua capacidade de cumprir a função dos ingredientes proteicos (DAMODARAN, 2010).

A produção de peptídeos bioativos vem sendo tratada com relevância. Grande parte desses peptídeos relatados na literatura provém de matrizes de proteínas de alto custo como leite (ULUKO et al. 2013a, 2013b, 2014; ROCHA et al., 2017) e ovo (SUN et al., 2014; GROOTAERT et al., 2019) o que na maioria dos casos torna sua aplicação pouco viável economicamente.

Atualmente se destacam processos que visam o aproveitamento de resíduos agrícolas para substituir recursos não renováveis. Portanto, os resíduos gerados pelas agroindústrias são uma fonte rica em proteínas e tornaram-se uma alternativa para a obtenção de compostos com

bioatividade, principalmente de hidrolisados de proteínas. Após a obtenção de peptídeos bioativos eles podem ser utilizados em rações, alimentos, cosméticos e drogas, como agentes bioativos (SHAHIDI, ZHONG, 2008; LEMES et al., 2016a).

Pesquisadores têm utilizado tecnologias limpas como ultrassom e micro-ondas, para auxiliar a hidrólise de várias proteínas, tais como: proteína do leite (ULUKO et al., 2013a), proteína clara de ovo (JOVANOVIĆ et al., 2016), farinha de glúten de milho (ZHOU et al., 2017). Não foram encontrados estudos aplicando ultrassom e micro-ondas como pré-tratamento de hidrólise enzimática de penas de frango. Existe um trabalho com aplicação de ultrassom e hidrólise de penas de frango, no entanto neste, Elashi et al. (2014) aplicaram o ultrassom como pós-tratamento para avaliar o tamanho das partículas e não como um tratamento antes da hidrólise enzimática para aumentar sua eficiência.

Diante do exposto, na presente pesquisa foram utilizadas penas de frango, subproduto abundante da agroindústria brasileira, para extração e hidrólise da sua queratina. Como pré-tratamento da hidrólise enzimática, foram aplicadas as tecnologias emergentes de ultrassom e micro-ondas, com vistas ao aumento de sua eficiência e ao aumento da qualidade dos hidrolisados obtidos. Foi utilizada uma enzima não purificada, característica de aplicação industrial e disponível no mercado (Savinase<sup>®</sup> 16L). A metodologia estabelecida visou, além da agregação de valor às penas, a utilização poucos reagentes químicos de baixo custo e o alcance de menor tempo de processo possível. Como produto, esperou-se obter um hidrolisado proteico, composto de peptídeos de baixa massa molecular com propriedades nutricionais, bioativas e funcionais, tais como: considerável teor de proteína solúvel de alta digestibilidade, atividade antioxidante, poder emulsificante, partículas com tamanho próximo ao de nanomateriais, passíveis de fácil absorção cutânea e intestinal. Pelas características desejáveis, o produto pode ter potencial para uso na indústria de alimentos, cosmética, farmacêutica, de ração, bem como na agricultura.

## 2 OBJETIVO GERAL

Estabelecer uma metodologia para extrair e hidrolisar queratina de penas de frango com uso de enzima comercial e tecnologias de ultrassom e micro-ondas para obtenção de hidrolisado com qualidade nutricional, funcional e bioativa.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter hidrolisado proteico com peptídeos bioativos através de enzimólise da queratina de penas de frango, por metodologia diferenciada e favorável ao meio ambiente;
- Estudar os parâmetros da extração e hidrólise enzimática de queratina de penas de frango (tempo, temperatura, concentração de substrato, enzima e reagentes);
- Avaliar os efeitos do ultrassom e das micro-ondas na hidrólise enzimática da queratina;
- Determinar o perfil de massas moleculares dos hidrolisados;
- Avaliar a digestibilidade *in vitro* e a capacidade antioxidante dos hidrolisados;
- Avaliar a solubilidade da proteína, a estabilidade da emulsão e a capacidade emulsificante dos hidrolisados;
- Analisar as propriedades estruturais dos hidrolisados;
- Determinar propriedades físicas e reológicas do hidrolisado.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 PENAS DE FRANGO

A natureza criou materiais com propriedades surpreendentes que muitas vezes são desperdiçados pela indústria ou não são utilizados em todo o seu potencial. Estes materiais devem ser melhor aproveitados, não apenas por razões ecológicas, mas por suas excelentes características intrínsecas, com a vantagem do seu baixo custo. Um material que merece destaque neste contexto é a pena de frango, pois esta constitui uma importante fonte renovável de biopolímeros (ESLAHI, DADASHIAN, NEJAD, 2013).

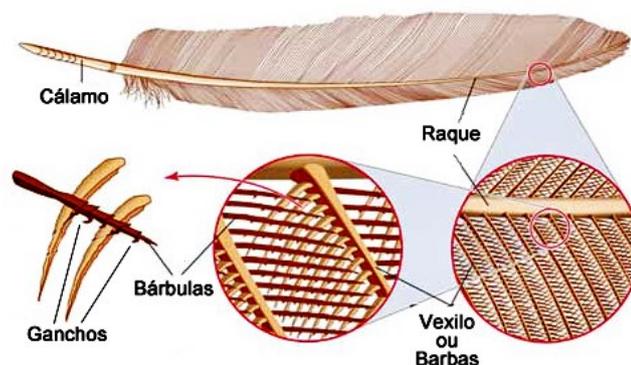
Dados da Associação Brasileira de Proteína Animal (2018) indicam que a produção de carne de frango no Brasil em 2017 superou 13,05 milhões de toneladas, alcançando segundo lugar no mundo e consolidando a carne de frango como terceiro item da pauta de exportação nacional. Aliado ao crescimento do setor, há a geração de penas, oriundas da produção da carne. Quando não processadas, estas penas tornam-se resíduo altamente poluente (GUPTA et al., 2016).

As penas representam de 5 - 7 % do peso corporal das aves domésticas e a produção mundial de carne de frango gera aproximadamente 5 milhões de toneladas de penas por ano, sendo que o valor da pena coletada é baixo na indústria avícola. As estratégias tradicionais utilizadas para a eliminação das penas, como a queima por incineração, descarte em aterros ou transformação em farinha de penas, alimentos de baixa qualidade para os animais, são de alto custo, difíceis e/ou não eficazes. Por outro lado, estes métodos de eliminação são limitados devido à enorme emissão de gases do efeito estufa, que representa um grande perigo para o ambiente (VERHEYEN et al. 1996).

##### 3.1.1 Composição das penas de frango

A estrutura da pena (Figura 1) é composta de um núcleo central rígido chamado de raque, do qual as barbas, fibras macias e interligadas, se ramificam. Aproximadamente, metade da pena é composta de pluma (barbas) e a outra metade de hastes principais (raque) (SCHMIDT, 2001; REDDY, YANG, 2007; ESLAHI et al., 2014).

Figura 1 - Estrutura de uma pena.



Fonte: Ornithos Escola (2019).

As penas de frango são ricas em proteínas, contendo pelo menos 75 %, mas em média pode alcançar 85 % de proteína, sendo 90 % do total queratina. Seu teor de umidade varia entre 6 e 13 %, lipídeos de 2 a 10 % e minerais em média até 1 %. Estas variações estão relacionadas ao tempo de secagem das penas, processo de limpeza e desengorduramento além da própria constituição dos animais (FAKHFAKH et al., 2011; TESFAYE et al., 2017).

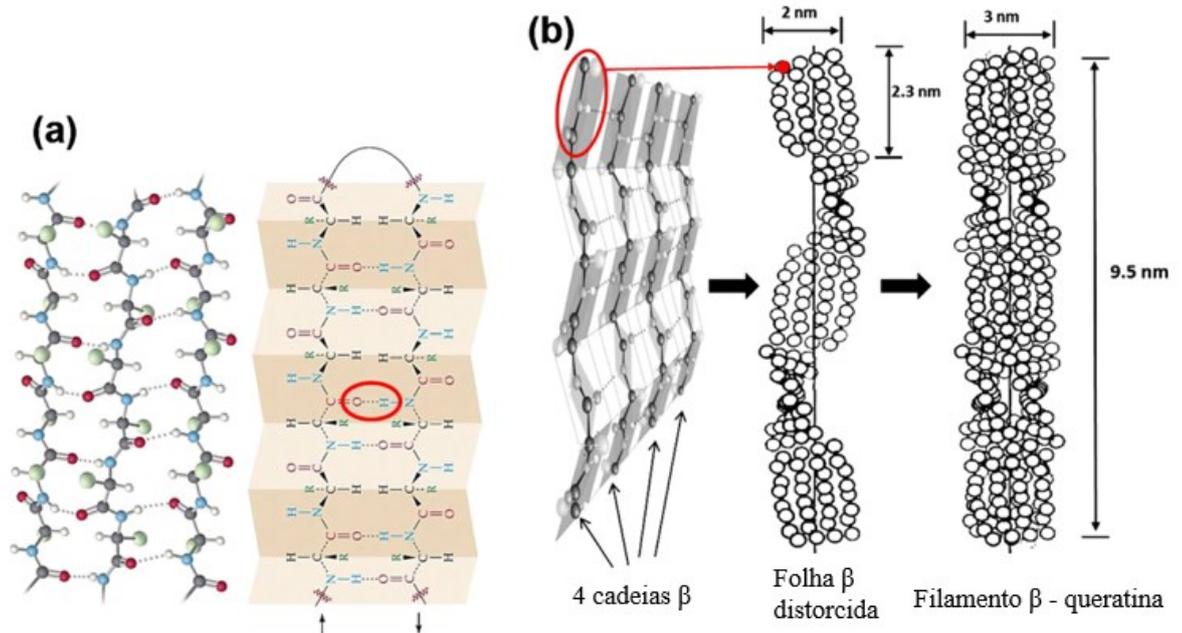
A queratina é uma proteína insolúvel em água e na maioria dos solventes, polares e apolares. É um polipeptídeo com massa molar média da ordem de 10.000 a 12.000  $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$  (10 a 12 kDa). É constituída por aminoácidos como: serina, glicina, valina, alanina, arginina, leucina, isoleucina, cisteína e em menores quantidades lisina, metionina e histidina. Dentre estes, a cisteína merece destaque pois os átomos de enxofre presentes em suas moléculas tendem a reticular um ao outro, formando pontes dissulfeto, e isso contribui para tornar a proteína resistente, forte e leve (FRASER, PARRY, 2008; WANG et al., 2016).

A queratina se apresenta sob duas formas estruturais subdivididas em  $\alpha$  e  $\beta$ -queratina. A queratina de penas possui conformação na sua maioria  $\beta$ , formando folhas  $\beta$ -pregueadas que, junto com pontes dissulfeto (ligação S-S entre duas cisteínas), ligações de hidrogênio (interação de um  $\text{H}^+$  com um  $\text{O}^-$ ) e forças hidrofóbicas (interações apolares), lhe dão estabilidade (WANG, CAO, 2012).

Pode-se observar na Figura 2 a estrutura pregueada da  $\beta$ -queratina, onde também é detalhada a disposição de filamentos: (a) modelo bola-e-bastão da cadeia polipeptídica e ilustração da folha-beta pregueada que consiste de cadeias empacotadas lateralmente, estas cadeias são mantidas juntas por pontes de hidrogênio intermoleculares (círculo vermelho); (b) desenho esquemático da formação do filamento de beta-queratina onde uma cadeia polipeptídica dobra-se para formar quatro cadeias  $\beta$  que se ligam através de ligação de

hidrogênio, resultando em uma folha pregueada que se torce para formar a folha  $\beta$  distorcida (helicoidal). E duas folhas se juntam para formar um filamento de beta-queratina (WANG et al., 2016).

Figura 2 - Estrutura pregueada da  $\beta$ -queratina. (a) modelo bola-e-bastão; folha pregueada (b) formação do filamento de beta-queratina.



Fonte: Wang et al. (2016).

As cadeias laterais (R) de aminoácidos voltam-se para cima ou para baixo do plano da folha. Estas apresentam alto conteúdo de cistina (cisteína + cisteína), que possui as ligações dissulfeto e distingue a queratina como proteína de alto teor de enxofre se comparada à outros biopolímeros (WANG et al., 2016).

É provável que a pena de aves constitua o material queratínico mais abundante na natureza visto que, de sua proteína total, cerca de 90 % é queratina (ONIFADE et al., 1998). Os seus possíveis usos por vezes são subaproveitados, considerando-se que a queratina de penas é uma fonte potencial de biomaterial de baixo custo, ecológico e comercial (POOLE et al., 2009; SHI et al., 2014).

Gupta e Sharma (2016) mostram que a queratina é um componente importante para a produção de vários produtos de valor agregado: cosméticos (como cremes, shampoos e condicionadores), produtos biomédicos (como biomateriais para regeneração de tecidos), filmes, fibras, hidrogéis, micro e nanopartículas para fins de alimentos, podendo também ser usada na indústria têxtil, na agricultura e em outras indústrias. Sendo assim, a pena de frango,

por apresentar em sua composição alta concentração de queratina, pode ser explorada a fim de agregar valor aos seus produtos derivados.

### 3.1.2 Utilização da queratina de penas de frango

A queratina é uma proteína altamente resistente à proteólise devido às ligações cruzadas de dissulfeto existentes internamente nas cadeias polipeptídicas que são difíceis de clivar. Assim, para sua dissolução, é necessário aplicar condições de reação favoráveis, que a tornem quimicamente reativa, fazendo com que os grupos funcionais reajam, especialmente as pontes dissulfeto (-S-S), os grupo amino (-NH<sub>2</sub>) e ácido carboxílico (-COOH) da cadeia polipeptídica. Por apresentar esta resistência, as penas são comumente submetidas à tratamentos térmicos para produzir farinha de penas cuja qualidade proteica é baixa (GUPTA et al., 2012; POOLE, CHURCH, 2015; GUPTA, SHARMA, 2016). Para obtenção da farinha de penas, que é utilizada como ração animal, as penas são submetidas à processo hidrotérmico onde são cozidas sob altas pressões (300 a 350 kPa), a altas temperaturas (133 a 150 °C). Contudo este tratamento hidrotérmico, resulta na diminuição de aminoácidos como a cisteína e destruição de aminoácidos essenciais como metionina, lisina e histidina, sendo reportada por conter baixo valor nutricional e baixa digestibilidade (PAPADOPOULOS et al., 1986; TIWARY, GUPTA, 2012).

Uma alternativa à produção de farinha é a extração da queratina das penas, sendo possível obter produtos de maior qualidade e valor agregado. Por vezes limitações no processamento de penas de frango como a sua baixa solubilidade em água, restringem seu uso e aumentam o custo do processo para extração de queratina (REDDY, YANG, 2007). Para aumentar sua solubilidade em água, utiliza-se elevadas temperaturas e pH ácido ou básico. A queratina das penas também torna-se mais solúvel na presença de agente redutor químico como sulfito de sódio (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>) ou sulfeto de sódio (Na<sub>2</sub>S) que ajudam na quebra das ligações cruzadas dissulfeto em grupos tiol (-SH) livres.

Dentre as metodologias usadas para extrair queratina de penas de frango, o método Shindai desenvolvido por Nakamura et al. (2002) é muito utilizado. Se baseia em processos químicos oxidativos e redutores, para extração de proteínas de cabelo humano, também é eficaz para lã, penas de frango, pelos de ratos e unhas humanas. Estes autores basearam-se no fato de que a combinação de tiouréia e ureia na presença de um redutor pode efetivamente extrair as proteínas destas matérias-primas proteicas. Este método foi utilizado para extração da queratina

de penas de aves domésticas em condições de redução (MOORE et al. 2006; KHOSA, ULLAH, 2013), porém ele tem a desvantagem de usar Tris-HCl, tiouréia, ureia e 2- mercaptoetanol, que é tóxico, pode o tornar oneroso, além de gerar odores fortes no processo.

Alguns pesquisadores tentaram produzir partículas de penas por distintos métodos, tais como atrito mecânico, regeneração a partir da solução de queratina, trituração de filmes, secagem por pulverização ou eletro-pulverização. Longos tempos de diálise, elevados custos de produção, segurança e problemas ambientais constituem as principais deficiências destas vias de obtenção. A exemplo do atrito mecânico que envolve cortar e esmagar as fibras com fresadoras adequadas, mas tem alto consumo de energia (ESLAHI et al., 2014).

Após extraída das penas, a queratina, pode ser transformada em hidrolisados líquidos, géis, películas, esferas, nano e micropartículas, possibilitando inúmeras aplicações em química verde, ciências alimentares, agricultura, indústrias têxteis, farmacêuticas e de cosméticos. Eslahi et al. (2014) investigaram a produção de nanopartículas de penas por hidrólise enzimática. Segundo os autores, essa seria a abordagem mais promissora devido às condições mais brandas do processo, não resultando em subprodutos prejudiciais ao meio ambiente.

## 3.2 HIDROLISADOS PROTEICOS

### 3.2.1 Hidrólise enzimática da queratina

A queratina é uma proteína que não é facilmente hidrolisada pela maioria das enzimas proteolíticas. Sua estrutura apresenta-se sob a forma de um empacotamento rígido do polipeptídeo em conformações  $\alpha$ -hélice e folha  $\beta$ , com ligações dissulfeto, ligações de hidrogênio e pontes salinas. Consequentemente, métodos térmicos e termoquímicos são amplamente utilizados para modificar a estrutura da queratina das penas de frango antes da sua utilização como farinha de penas ou antes da hidrólise enzimática para obtenção de hidrolisados (FORGÁCS, G. et al., 2013).

Estes tratamentos térmicos envolvem geralmente aquecimento das penas a alta temperatura ( $\geq 100$  °C) e pressão ( $\geq 300$  kPa), na forma natural ou em solução ácida ou alcalina, para clivar as ligações dissulfeto e interromper a interação hidrofóbica, tornando assim a proteína mais solúvel e digerível. Estes métodos são, contudo desvantajosos porque promovem a destruição de aminoácidos termolábeis e provocam a racemização de aminoácidos. Deste modo, os hidrolisados de queratina produzidos por estes métodos têm baixa qualidade proteica

e a sua utilização como alimento para animais é muito limitada devido à baixa digestibilidade dos aminoácidos (LASEKAN et al., 2013).

A utilização de tratamento químico, seguido de hidrólise enzimática de penas, tem sido sugerido por vários autores como melhor método para produzir concentrado de proteína de penas ou hidrolisado de queratina de penas. O tratamento de um substrato de penas com uma solução alcalina (um agente redutor) sob uma temperatura branda, entre 70 e 80 ° C pode proporcionar o potencial de oxidação-redução necessário para a clivagem de ligações dissulfeto formando uma estrutura de proteína mais aberta que irá melhorar a acessibilidade da enzima aos sítios ativos dentro da estrutura (MOKREJS et al., 2011). A combinação de regime de baixa temperatura e tempo de incubação curto durante a etapa alcalina pode ajudar a prevenir a perda e a racemização de aminoácidos, além de evitar o excesso de clivagem peptídica. Assim, este pode ser um método econômico, rápido e seguro de produzir hidrolisado de queratina.

Ramnani e Gupta (2007) verificaram que proteases convencionais podem ser usadas para degradar penas na presença de agentes redutores químicos ou biológicos. Os autores observaram que a pepsina e a tripsina só podem degradá-las depois que os resíduos hidrofóbicos superficiais na estrutura da queratina são clivadas por outras proteases, liberando os sítios ativos da lisina e da arginina localizadas na estrutura interna da proteína.

Fakhfakh et al. (2011) demonstraram que a queratinase alcalina, derivada do microrganismo *B. pumilus A1* isolado da água poluída de abatedouros, solubilizou completamente penas de frango em 2 dias a 45 °C em meio alcalino. Foi também referido que o hidrolisado possui um potencial antioxidante e pode ser utilizado como ingrediente alimentar funcional.

Para a hidrólise enzimática de penas de frango, foi utilizada savinase® em diversas pesquisas (LEE et al., 1991; GUPTA et al., 2012; ESLAHI et al., 2014). A savinase (EC.3.4.21.62) é uma enzima queratinolítica que é útil em setores industriais, como reciclagem de penas, couro, têxteis, alimentos, fertilizantes e cosméticos (KOTHARI; RANI; GOYAL, 2017). Segundo a Novozymes (2019), fabricante da Savinase®, esta enzima é uma endoprotease que quebra cataliticamente as ligações peptídicas, levando à solubilização dos peptídeos por dissolução simples ou pelos surfactantes disponíveis. Além disto, considera que a Savinase® não tem muita especificidade, nem requerimento de aminoácidos em cada lado da ligação peptídica, e reporta que a Savinase® catalisa a hidrólise estereoseletiva de alguns ésteres, bem como amidas sob condições alcalinas. É recomendada para uso em soluções com pH variando entre 6,5 e 11, sendo o pH ótimo de 8 a 10 e temperatura ótima de 30 a 60 ° C.

Pesquisas mostram (RAMNANI, GUPTA, 2007; ESLAHI et al., 2014; SHARMA, 2018) que a eficiência da hidrólise enzimática depende de vários fatores, tais como: tipo de enzima, concentração enzimática, tempo de reação, concentração do substrato, temperatura, adição de agente redutor, etc. e que estes fatores muitas vezes interagem uns com os outros.

Zou et al. (2016) estudaram a enzimólise de proteína de cérebro de porcos e propuseram um modelo de reprodução do comportamento cinético do sistema sob estudo, no qual foi deduzido o mecanismo e feita a validação do modelo cinético da enzimólise. Neste estudo foi evidenciada uma relação do grau de hidrólise com a concentração de enzima, concentração de substrato e o tempo de enzimólise. Nesta relação, o grau de hidrólise apresentou-se como uma função logarítmica da relação entre enzima e substrato e do tempo.

Pagán et al. (2013) concluíram que o grau de hidrólise do substrato de ossos de porco aumentou com concentrações mais altas da Neutrase<sup>®</sup> e tempos mais longos do processo de hidrólise. O mais alto grau de hidrólise (12,4 %) foi obtido após 120 min de hidrólise com uma relação enzima / substrato de 2,5 %. A hidrólise enzimática foi realizada a 55 ° C e um pH de 7,0.

Como estes fatores são relevantes e agem de diferentes formas, a depender também do tipo de proteína (substrato), é necessário estudar a sua ação e interação em processos específicos, sendo um dos objetivos desta pesquisa.

### 3.2.2 Utilização de proteínas hidrolisadas e seus benefícios à saúde

O desenvolvimento tecnológico no processamento de alimentos e os avanços nas tecnologias de separação resultaram em uso de hidrolisados de proteínas dietéticas e suas frações em diversos produtos alimentícios. Hidrolisados proteicos, como os hidrolisados de proteínas do leite e de ovos, são usados devido às suas desejáveis propriedades nutricionais e tecnológicas. São fonte principal de proteína em suplementos e produtos de nutrição esportiva, alimentos de fonte única (fórmulas infantis e substitutos de refeições) e alimentos médicos, tais como produtos para administração parentérica (RUTHERFURD, 2010).

Em relação à sua atuação na saúde, os hidrolisados proteicos têm sido utilizados para melhorar a digestão e absorção de fontes de proteínas pouco digeríveis e, mais recentemente também foram citados como uma potente fonte de peptídeos bioativos (RUTHERFURD, 2010).

Os peptídeos bioativos são compostos que exibem um efeito nas funções ou condições corporais e podem influenciar positivamente a saúde humana. Eles diferem amplamente em sua composição de aminoácidos, estrutura química e, portanto, em sua função biológica, podendo

ter efeitos anti-hipertensivos, antioxidantes, hipocolesterolêmicos, antitrombóticos, imunomoduladores, além de atividade antimicrobiana, antiprotzoário e antiviral, o que os tornam atraentes para aplicação em alimentos e produtos farmacêuticos. Os peptídeos bioativos podem conter de três a 20 resíduos de aminoácidos por molécula. Os peptídeos tornam-se ativos quando liberados da sequência proteica principalmente por hidrólise química ácida ou alcalina, ação proteolítica de microrganismos ou hidrólise enzimática. No entanto, os dois últimos são mais amplamente utilizados para aplicações industriais alimentares e farmacêuticas (LEMES et al., 2016a). Isto se deve à sua especificidade de ação no substrato proteico, necessidade de temperaturas brandas e pouco uso de reagentes se comparados aos processos químicos, possibilitando a formação de peptídeos de melhor qualidade, além de não resultar em impactos ambientais negativos.

Os peptídeos mais utilizados são derivados de proteínas caras, por exemplo, alimentos (CHAE, IN, KIM, 1998; ULUKO, 2013b; ADJONU, 2014; ROCHA et al., 2017; ZHOU et al., 2017), o que pode tornar sua aplicação inviável economicamente. Processos que visam a utilização de subprodutos agrícolas para substituir recursos não renováveis têm se destacado, uma vez que os resíduos gerados pelas agroindústrias são uma fonte rica em proteínas e uma alternativa para obter compostos com bioatividade, principalmente a partir de hidrolisados proteicos.

Atualmente, tem-se em vista o conceito de bioprospecção para peptídeos bioativos de materiais contendo queratina, como lã, cabelo, pele e penas, que apresentam uma oportunidade para o desenvolvimento de novos ingredientes alimentares funcionais e nutracêuticos, podendo agregar valor a fontes naturais baratas e abundantes. São relatados na literatura vários exemplos de peptídeos ricos em prolina com bioatividade produtiva em modelos de doença humana incluindo formação de tumor, controle de hipertensão e de doença de Alzheimer. As substâncias contendo a queratina, como penas, lã e pele, muitas vezes descartadas após o abate de animais, podem ser consideradas como futuros nutracêuticos importantes. Com base nos trabalhos disponíveis na literatura, os hidrolisados de queratina geralmente mostram uma atividade antioxidante mais forte, enquanto que os hidrolisados de colágeno apresentam frequentemente, melhor potencial anti-hipertensor. Quando hidrolisados enzimáticos de farinha de carne (resíduo de colágeno) foram comparados com a queratina de resíduos de farinha de penas de frango (contendo também uma mistura de chifres e casco de vaca e búfalo), Ohba et al. (2003) observaram que a atividade inibidora da enzima conversora de angiotensina (ACE), que atua como anti-hipertensivo, foi menor no hidrolisado de farinha de penas do que no hidrolisado de farinha de carne. A baixa atividade inibidora da ACE pode resultar da menor concentração de

prolina e hidroxiprolina em resíduos de queratina em comparação com os resíduos de colágeno. No entanto, a queratina mostra atividades antioxidantes mais fortes, como quando comparada com os resíduos de colágeno, cujas atividades de captura do radical DPPH<sup>•+</sup> foram fracas.

De acordo com Fakhfakh et al. (2011) o hidrolisado obtido de penas de frango hidrolisadas com queratinase da bactéria *Bacillus pumilus* A1 teve uma elevada atividade antioxidante. A atividade de inibição do radical DPPH<sup>•+</sup> mais elevada foi de 0,3 mg · L<sup>-1</sup> e foi obtida após 48 h em meio alcalino.

Quadro 1- Propriedades bioativas e funcionais de hidrolisados de diferentes subprodutos do frango.

Subprodutos hidrolisados	Propriedades bioativas e funcionais	Referências
Osso da coxa sobrecoxa	Anti-hipertensivo	Saiga et al. (2008); Nakade et al. (2008); Cheng et al. (2009a, b)
Vísceras	Emulsificante Antioxidante e anti-hipertensivo	Jamdar e Harikumar (2008a, b); Jamdar et al. (2012)
Pena hidrolisada por hidrólise ácida	Anti-hipertensivo	Karamac et al. (2005)
Penas e farinha de penas	Antioxidante	Fakhfakh et al. (2011); Ohba et al. (2003)
Sangue	Anti-hipertensivo	Huang e Liu (2010)

Fonte: Adaptado de Lasekan et al. (2013).

O tipo da enzima, o grau de hidrólise (GH) e a massa molecular dos peptídeos são fatores que influenciam a atividade dos hidrolisados. Substratos hidrolisados com enzima alcalase tiveram boa atividade inibitória de ACE (LASEKAN et al., 2013); peptídeos de baixa massa molecular (<1 kDa) tiveram boa correlação com a atividade antioxidante (JE; PARK; KIM, 2005; GRINGER et al., 2016).

Após os peptídeos bioativos terem sido obtidos, purificados, e ter sido provado seu poder de ação, eles podem ser aplicados a alimentos ou drogas como agentes bioativos. Suas propriedades físico-químicas também podem ser exploradas.

### 3.2.3 Propriedades funcionais das proteínas hidrolisadas

As propriedades funcionais das proteínas nos alimentos estão relacionadas à suas características estruturais e físico-químicas. A compreensão fundamental das propriedades físicas, químicas, nutricionais e funcionais das proteínas e as mudanças que essas propriedades sofrem durante o processamento é essencial quando se quer melhorar o desempenho das proteínas presentes em alimentos e quando se desejam fontes proteicas novas ou menos dispendiosas para competir com proteínas alimentares tradicionais (DAMODARAN, 2010).

O processo de hidrólise enzimática tem sido destacado na melhoria das propriedades funcionais das proteínas como solubilidade, poder emulsificante, textura, tendo grande aplicabilidade em produtos alimentícios. A hidrólise enzimática de proteínas se mostra vantajosa em comparação com a hidrólise química, térmica e microbiana por produzir peptídeos com desejável funcionalidade. É realizada com enzimas devido ao modo de ação altamente específico, facilidade de controle, uso de condições mais brandas e tendência a não causar danos aos aminoácidos. Os cuidados no processo e na seleção da enzima indicam que os hidrolisados podem ser produzidos especificamente para aplicações alimentares (ADJONU et al., 2014).

As propriedades funcionais dos hidrolisados proteicos dependem do grau de hidrólise (GH) e das propriedades físico-químicas, isto é, tamanho, solubilidade, etc., dos polipeptídeos e oligopeptídeos do hidrolisado (DAMODARAN, 2010).

A hidrólise parcial de proteínas com uso de enzimas proteolíticas é uma das estratégias para melhorar as propriedades funcionais. Estas, como solubilidade, dispersibilidade, formação de espuma e emulsificação, podem ser melhoradas pela proteólise limitada das proteínas. Os hidrolisados proteicos têm muitos usos em alimentos para fins especiais, como alimentos geriátricos, fórmulas infantis não alergênicas, bebidas para esportistas e alimentos dietéticos. Como os hidrolisados proteicos podem ser digeridos com facilidade, eles são úteis em fórmulas infantis e em alimentos geriátricos (DAMODARAN, 2010).

### 3.2.4 Grau de hidrólise de proteínas

Os hidrolisados proteicos são principalmente produzidos a partir de hidrólise enzimática e/ou química e consistem em misturas complexas de aminoácidos livres e peptídeos de diferentes comprimentos de cadeia. O grau ao qual uma fonte de proteína foi hidrolisada é um reflexo do número de ligações peptídicas quebradas e, portanto, do tamanho médio dos peptídeos presentes. O grau de hidrólise (GH) é definido como a proporção de ligações peptídicas clivadas numa proteína hidrolisada. Vários métodos são correntemente utilizados

para determinar o grau de hidrólise dos hidrolisados alimentares. Os mais comumente usados incluem o pH-stat, ácido trinitrobenzenossulfônico (TNBS), *o*-ftaldialdeído (OPA), Nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético (SN-TCA) e titulação com formol. Os métodos de titulação TNBS, OPA e titulação com formol são baseados na medição de grupos amino gerados por hidrólise, ambos determinam diretamente o GH. Não existe consenso quanto ao melhor método para determinar o GH de hidrolisados de proteínas (RUTHERFURD, 2010).

A titulação com formol (CH<sub>2</sub>O), *Sorensen method* (AOAC 1995), é usada para determinar o grau de hidrólise através do acompanhamento da liberação de aminoácidos e peptídeos durante a hidrólise das proteínas por enzimas proteolíticas. Este método relaciona o número de ligações peptídicas quebradas como uma proporção do número total de ligações peptídicas presentes na amostra íntegra, uma vez que o formaldeído (formol) em excesso se combina facilmente com os grupos amino livres dos aminoácidos, que nesta reação são titulados com solução alcalina. É um método fácil e de resposta rápida para determinação de GH, sendo o método escolhido para determinação dos graus de hidrólise para o acompanhamento a cada 2 horas de processo desta pesquisa.

Existem outras metodologias mais modernas utilizadas em análise proteômica (HAN, ASLANIAN, YATES, 2008; EMIDIO et al., 2015) que permitem a avaliação do grau de hidrólise como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada à espectro de massas, no entanto estas são mais sofisticadas e demandam mais etapas e custo operacional. Em contrapartida elas oferecem uma análise mais detalhada da molécula, sendo permitida a determinação das massas moleculares. Assim, na presente pesquisa a metodologia de cromatografia líquida de interação hidrofóbica com acoplamento a ionização de massas por nebulização e analisador QTOF (HILIC - ESI - QTOF - MS) foi usada para análise dos hidrolisados finais produzidos.

### 3.3 TECNOLOGIAS DE ULTRASSOM E MICRO-ONDAS NA HIDRÓLISE DE PROTEÍNAS

Diferentes pré-tratamentos, isoladamente ou em combinação, têm sido estudados com o objetivo de melhorar a eficiência da hidrólise enzimática e de modificar as características funcionais dos hidrolisados de proteínas, incluindo aplicação de calor, aplicação de ultrassons, micro-ondas, aplicação de alta pressão e métodos químicos. Tais métodos têm efeitos variados sobre os produtos da hidrólise enzimática (ULUKO et al., 2013a).

Técnicas alternativas como micro-ondas, sono- ou foto- química assistida têm sido aplicadas por pesquisadores nos últimos 20 anos, aproveitando os avanços da tecnologia para não apenas economizar energia, mas também reduzir os tempos de reação, simplificar as condições experimentais e aumentar a eficácia dos catalisadores. Na química das micro-ondas, agora é possível usar equipamentos comerciais para controlar todos os aspectos do aquecimento por micro-ondas, melhorando muito a segurança e a reprodutibilidade. As micro-ondas permitem um aquecimento e arrefecimento muito rápidos, evitando a necessidade de prolongamento do tempo de residência a altas temperaturas (ANASTAS et al., 2009).

O uso de irradiação de micro-ondas para acelerar reações químicas ou enzimáticas tem sido amplamente explorado. As economias de energia em comparação com o aquecimento convencional dependem da eficiência na conversão de energia elétrica em energia de micro-ondas, bem como das características do reator, da quantidade de mistura reacional e da capacidade dos componentes de reação para absorver energia de micro-ondas. O uso de aquecimento por micro-ondas em escala industrial está em estágios iniciais de pesquisa, embora até agora ter sido considerado vantajoso em comparação com o aquecimento convencional. Anastas et al. (2009) reportam que na vanguarda da pesquisa de micro-ondas está se usando esta energia para suportar outras técnicas "verdes", tais como química livre de solventes ou aquosa e reatores com catalisadores e suportes recicláveis.

Além das micro-ondas, o ultrassom, é também considerado uma tecnologia limpa promissora. Sonoquímica é o uso de ondas sonoras de alta frequência (20 - 100 kHz) a fim de gerar cavitação acústica para iniciar ou acelerar reações químicas. O colapso das bolhas formadas em solução pelas ondas sonoras resulta em temperatura e pressão muito altas, e mais energia disponível por molécula do que aquecimento térmico. A aplicação de ultrassom pode quebrar ligações químicas e acessar novos caminhos de reação. As ondas sonoras também podem levar a "falsa sonoquímica": efeitos análogos à agitação de alta velocidade que também podem melhorar a eficiência das reações químicas (ANASTAS et al., 2009). Para a indústria alimentícia, esta nova tecnologia pode ser de interesse significativo, pois permite que a química de renováveis seja promovida, isto é, aproveitando subprodutos como biomassa rica em celulose, amido e proteínas, e realizando reações químicas usando solventes e reagentes ambientalmente corretos e em menores quantidades (WEISS, 2011).

Diversas pesquisas apontam que o ultrassom causa efeitos sobre as propriedades das proteínas (SORIA; VILLAMIEL, 2010). A aplicação de ultrassom de alta intensidade (com frequências de 16 -100 kHz) à uma proteína pode causar alterações químicas e físicas devido à cavitação, gradiente de temperatura, agitação dinâmica, tensões de cisalhamento e turbulência

(O'DONNELL et al., 2010; ARZENI et al., 2012). Os efeitos das ondas ultrassônicas nas proteínas são muito complexos, podendo ocorrer um aumento ou diminuição da susceptibilidade hidrolítica das proteínas, dependendo das condições e da intensidade do pré-tratamento, bem como sobre a natureza da protease ou proteína utilizada (ULUKO, 2014).

O uso de ultrassom ganha importância na hidrólise enzimática das proteínas, assistida ou como pré-tratamento do substrato proteico antes da hidrólise enzimática porque a redução da distribuição do tamanho de partículas pode ser alcançada, com a vantagem de ser uma técnica de processamento não-térmico, leve e que evita a formação de gases e a deterioração dos componentes alimentares e nutrientes (JOVANOVIĆ et al., 2016; ZOU et al., 2016).

As interações afetadas e a estrutura da proteína após o tratamento com ultrassom podem expor mais a molécula para a ação enzimática causando um aumento no grau de hidrólise e bioatividade. Assim, a aplicação de ultrassom à substratos proteicos vem sendo utilizada com sucesso antes da hidrólise enzimática, a fim de aumentar o grau de hidrólise e a bioatividade resultante dos hidrolisados em diferentes proteínas. Uluko et al. (2014) conseguiram aumentar o grau de hidrólise de concentrado proteico de leite, além disso, os hidrolisados resultantes tiveram uma maior atividade inibitória da ACE por meio do uso do ultrassom.

Jovanović et al. (2016) relataram que os pré-tratamentos de ultrassom parecem melhorar muito a hidrólise enzimática de proteínas da clara de ovo em diferentes condições, quando comparado aos outros métodos estudados.

Com base na literatura pesquisada, foi possível elaborar o Quadro 2, onde são listados trabalhos que envolvem a hidrólise de proteínas, produção de peptídeos bioativos bem como novas tecnologias utilizadas.

Quadro 2 - Estudos da hidrólise de proteínas, produção de peptídeos bioativos e uso de novas tecnologias de tratamento.

Estudo	Parâmetros estudados	Enzima (s) utilizada (s)	Matéria prima	Resultados	Referência
Extração de queratina de penas usando diferentes tratamentos químicos	Potencial antioxidante dos peptídeos	Não utilizou enzima. Utilizou 2-mercaptoetanol (TME), sulfeto de sódio (SS) e dodecil sulfato de sódio (SDS)	Penas de frango	A queratina extraída pelos três métodos teve potencial antioxidante. A redução de queratina com SS apresentou o melhor potencial antioxidante IC <sub>50</sub> de $0,533 \pm 0,061 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (DPPH)	Alahyaribeik e Ullah (2020)
Uso de tecnologia ultrassônica para formação de material polimérico a partir de queratina de penas	Processo de dissolução de penas de peru	Não utilizou enzima. Usou líquidos iônicos	Penas de peru	Foi possível otimizar o processo de dissolução através do uso de ultrassom e gerar um material polimérico biodegradável	Azmi, Idris, Yusof (2018)
Imobilização da enzima e hidrólise do soro de leite	Potencial antioxidante dos peptídeos	Protease aspártica imobilizada de frutos de <i>Salpichroa organifolia</i>	Soro de leite	A enzima imobilizada apresentou maior estabilidade térmica. O soro atingiu um grau similar de hidrólise com ambas as formas da enzima (6 – 8 %). O hidrolisado foi considerado como uma fonte promissora de antioxidantes	Rocha et al. (2017)
Produção e caracterização de micropartículas de queratina de biomassa de penas	Atividade antioxidante e anticancerígena	Não utilizou enzima. Hidrólise química alcalina	Penas de frango	As micropartículas de queratina apresentaram potencial antioxidante significativo com níveis IC <sub>50</sub> de 9,02 e 13,15 g . mL <sup>-1</sup> , bem como 5,60 e 8,96 g . mL <sup>-1</sup> em bioensaios de eliminação de radicais DPPH e ABTS, respectivamente. Na condição de índices terapêuticos (TIs), as micropartículas exibiram um nível muito pequeno ou nulo de potencial anticancerígeno contra as linhagens celulares estudadas	Sharma et al. (2017)

\* DPPH = 2,2-difenil-1-picrilhidrazil; ABTS = 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico); IC<sub>50</sub> = concentração da amostra necessária para 50% de inibição do radical oxidante.

Quadro 2 – Continuação.

Estudo	Parâmetros estudados	Enzima (s) utilizada (s)	Matéria prima	Resultados	Referência
Pré-tratamentos com calor e ultrassom na enzimólise de farinha de glúten de milho	Cinética de hidrólise e estrutura proteica	Protamex Protease	Farinha de glúten de milho	As análises estruturais das proteínas (espectro de fluorescência, espectros de FTIR e CD), análises morfológicas (AFM e SEM) demonstram que o pré-tratamento combinado de ultrassom e calor proporcionou o melhor grau de hidrólise e melhoraram a taxa da reação de enzimólise	Zhou et al. (2017)
Aplicação de alta pressão hidrostática (HHP) para auxiliar a hidrólise enzimática de proteínas	Velocidade da hidrólise Poder alergênico das proteínas	$\alpha$ -quimotripsina e bromelina	Concentrado proteico de soro de leite	O grau de hidrólise (GH) aumentou com a pressão e com o tempo de processamento, variando de 4 a 17 %, num tempo de 30 min para diferentes pressões aplicadas. O aumento significativo do GH pode estar ligado à redução da antigenicidade das proteínas do soro	Ambrosi et al. (2016)
Pré-tratamento com ultrassom na enzimólise da clara de ovo	Grau e cinética de hidrólise. Distribuição do tamanho das partículas. Teor de grupos sulfidríla	Alcalase	Proteína da clara de ovo	O pré-tratamento com ultrassom apresentou um efeito importante no tamanho, uniformidade e carga das partículas da proteína, afetando também o teor de grupo sulfidríla. Foi benéfico para a hidrólise enzimática em comparação com o pré-tratamento térmico	Jovanović et al. (2016)
Identificação e caracterização de um peptídeo antioxidante de hidrolisado de queratina de penas	Atividade antioxidante Espectro de massa MALDI -TOF	Usou a bactéria <i>Bacillus subtilis</i>	Penas de frango	Foi identificado um peptídeo com atividade antioxidante (Ser-Asn-Leu-Cys-Arg-Pro-Cys-Gly) e determinado que representa uma porção de queratina de penas perto do seu terminal-N	Wan et al. (2016)

Quadro 2 – Continuação.

Estudo	Parâmetros estudados	Enzima (s) utilizada (s)	Matéria prima	Resultados	Referência
Produção de nanopartículas a partir de resíduos de penas por hidrólise enzimática, seguida de tratamento ultrassônico	Concentração enzimática, concentração do substrato e tempo de hidrólise. Efeito do ultrassom (como pós-tratamento) no tamanho das partículas	Savinase®	Penas de frango	O tamanho mínimo de partícula foi obtido usando 5 g. L <sup>-1</sup> de pena e 3,6 % de enzima no tempo de hidrólise de 243h; O tamanho médio das partículas hidrolisadas diminuiu de 297 para 127 nm após tratamento ultrassônico	Eslahi et al. (2014)
Produção de hidrolisados de penas	Atividade antioxidante, anti-hipertensiva e anti-diabetes	Usou bactéria <i>Chryseobacterium sp</i>	Penas de frango	Os hidrolisados de penas apresentaram propriedades antioxidantes. Também demonstraram atividade anti-hipertensiva por inibir a enzima conversora de angiotensina em 65 % e anti-diabetes por inibir a dipeptidil peptidase-IV em 44 %	Fontoura et al. (2014)
Aplicação de micro-ondas e ultrassom antes da hidrólise enzimática de proteínas do leite	Efeitos de pré-tratamentos de micro-ondas e ultrassom na cinética, grau de hidrólise, solubilidade proteica, amargor e atividade inibitória da enzima conversora angiotensina (ACE)	Alcalase Tripsina Neutrase Protease alcalina Flavourzyme	Concentrado proteico de leite	Os pré-tratamentos com ultra-som e micro-ondas melhoraram a hidrólise, solubilidade e atividade inibidora de ACE do concentrado dependendo da enzima e do tempo de pré-tratamento	Uluko et al. (2013a)
Aplicação de ultrassom de alta intensidade (HIUS) em proteínas alimentares	Impacto do ultrassom sobre a funcionalidade de proteínas alimentares utilizadas industrialmente	Não utilizada	Concentrado de proteína de soro de leite, isolado de proteína de soja e proteína da clara de ovo	A HIUS induziu modificações sobre propriedades funcionais, como gelificação, viscosidade e solubilidade, e essas mudanças são consideradas intimamente relacionadas com modificações moleculares, principalmente aumento de hidrofobicidade e variação de tamanho de partícula. Estas dependem da natureza da proteína e do seu grau de desnaturação e agregação	Arzeni et al. (2012)

Quadro 2 – Continuação.

Estudo	Parâmetros estudados	Enzima (s) utilizada (s)	Matéria prima	Resultados	Referência
Pré-tratamento com ultrassom em isolado de proteína de soja	Efeitos do pré-tratamento na hidrólise enzimática e nas propriedades emulsificantes dos hidrolisados	Papaína	Isolado de proteína de soja	O pré-tratamento combinado com ultrassom e a hidrólise enzimática controlada podem ser um método eficaz para a modificação da funcionalidade de proteínas globulares. O pré-tratamento com ultrassom foi capaz de melhorar a acessibilidade de algumas subunidades das proteínas da soja à hidrólise da papaína, resultando em mudanças no GH, solubilidade proteica (SP), hidrofobicidade superficial (H0) e estrutura secundária para US de 400W	Chen et al. (2011)
Produção de hidrolisado a partir da fermentação de penas de frango	Digestibilidade <i>in vitro</i> , potencial antioxidante	Queratinase alcalina de <i>B. pumilus</i> A1	Penas de frango	O hidrolisado de proteína de penas obtido teve um bom potencial antioxidante. Conteve grandes quantidades de peptídeos e aminoácidos. Além disso, apresentou uma digestibilidade <i>in vitro</i> muito alta em comparação com a das penas não tratadas	Fakhfakh et al. (2011)
Produção de hidrolisado de queratina através de hidrólise alcalina e enzimas	Eficiência da degradação das penas	Savinase® Ultra 16L, Greasex 50L	Penas de aves	O hidrolisado de queratina produzido teve alto teor de nitrogênio e nível razoável de sólidos inorgânicos. A tecnologia de dois estágios de hidrólise alcalina-enzimática de penas aves de capoeira em um ambiente de 0,3 % KOH atingiu alta eficiência sob condições de reação suaves (temperatura não superior a 70 °C com pH em uma região levemente alcalina)	Mokrejs et al. (2011)

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATÉRIA-PRIMA

Foram utilizadas penas de frango branco (*Gallus gallus domesticus*), provenientes da etapa de depenagem, obtidas de uma planta de processamento de frango na cidade de Palhoça, no Estado de Santa Catarina, Brasil. 10 kg de material úmido foram limpos e secos (item 4.3.1) no Laboratório de Processos com Membranas (LABSEM - EQA- UFSC).

A pena foi caracterizada quanto a umidade, cinzas, proteínas e lipídeos, seguindo os procedimentos analíticos da AOAC (2012), descritos nos métodos nº 950.46, 920.153, 928.08 e 920.39, respectivamente.

### 4.2 ENZIMA E ATIVIDADE ENZIMÁTICA

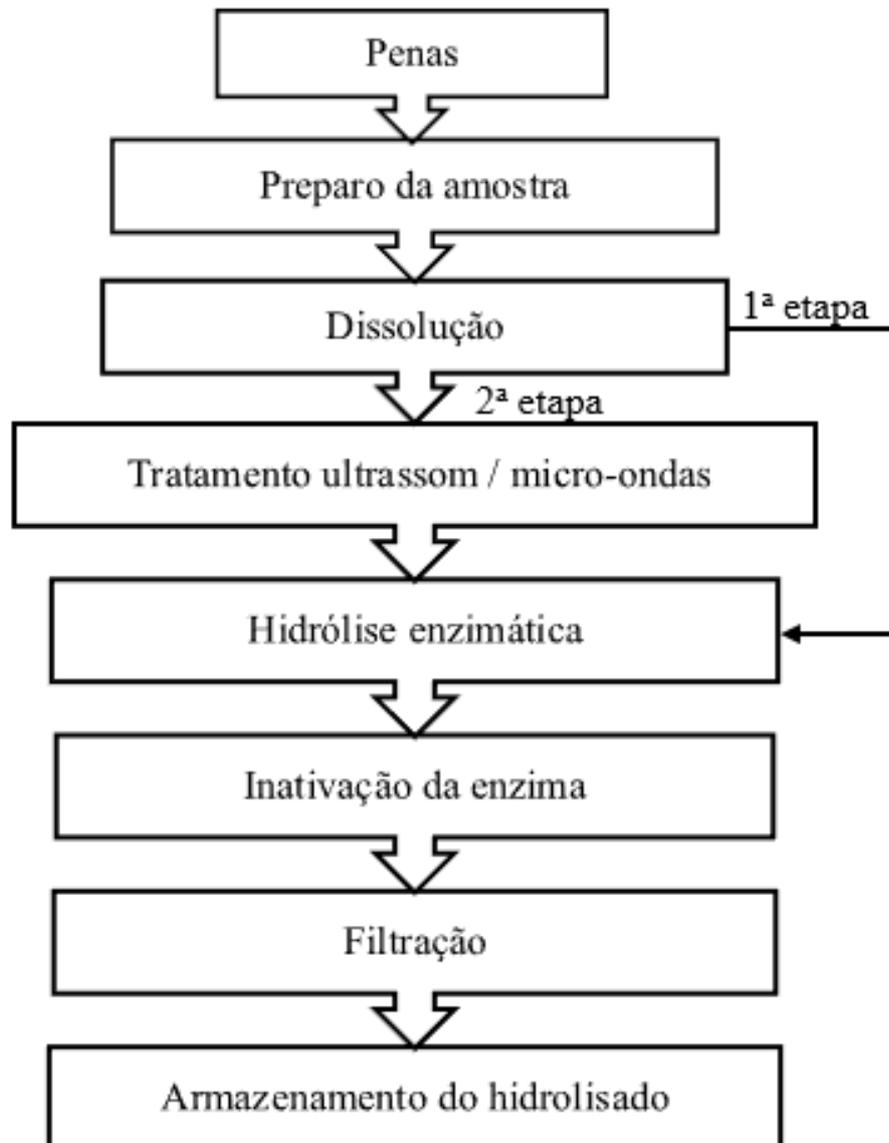
Foi utilizada a enzima alcalina serina endopeptidase, Savinase<sup>®</sup> (16L TYPE EX, EC.3.4.21.62, lote A-68546, Novozymes Latin America, Araucária-PR, Brasil), doada pela empresa Novozymes. A savinase<sup>®</sup> foi armazenada sob refrigeração ( $7 \pm 2$  °C), até o momento da sua utilização.

Foi realizado o ensaio quantitativo da atividade proteolítica da enzima Savinase<sup>®</sup> através de espectrofotometria, com azocaseína como substrato controle, segundo metodologia descrita em Ginther (1979) e Daroit (2009), com algumas modificações, sendo determinada em três pH's distintos: 8,4; 9,4 e 10,4. A reação enzimática foi feita através da mistura de 100 µL de tampão Tris-HCl (pH 8,4, 9,4 e 10,4), 300 µL de azocaseína 1% (diluída nos respectivos tampões pH 8,4, 9,4 e 10,4) e 100 µL da enzima adequadamente diluída. Esta mistura reacional foi incubada a 40 °C por 30 min, em banho agitado. Após a incubação, a reação foi interrompida pela adição de 600 µL de ácido tricloroacético (TCA, 10% m/v), sendo a mistura resfriada por 10 min a - 4 °C, em seguida centrifugada a 6.000g por 20 min. Após a centrifugação, 800 µL do sobrenadante foram pipetados e adicionados de 200 µL de NaOH (1,8 N). Por fim, a absorbância a 420 nm foi medida em espectrofotômetro UV-Vis (Quimis, Q8898U2M5). Um padrão foi preparado com as mesmas substâncias, diferindo apenas na ordem de adição do TCA, que foi adicionado antes da enzima para a incubação. Uma unidade de atividade enzimática da protease (U) foi definida como a quantidade de enzima que causou um acréscimo de 0,1 na absorbância por minuto, nas condições definidas para o ensaio.

#### 4.3 PROCESSAMENTO DAS PENAS E OBTENÇÃO DO HIDROLISADO

O processamento das penas de frango para obtenção do hidrolisado foi realizado de acordo com as etapas estruturadas no Fluxograma mostrado na Figura 3.

Figura 3 - Fluxograma de obtenção do hidrolisado de queratina de penas de frango.



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

#### 4.3.1 Preparo da amostra

*Limpeza:* As penas foram inicialmente lavadas com água, depois imersas em uma solução aquosa contendo 1 g/L de detergente neutro de uso doméstico durante 30 min a 45 °C, para remoção parcial da gordura. Enxagues consecutivos com água a 45 °C foram realizados e, ao final, com água destilada (ASTM, 2005).

*Secagem:* As penas foram secas a 45 °C durante 12 h em estufa de secagem (SPlabor, modelo SP-400, Presidente Prudente -SP, Brasil).

*Moagem:* As penas limpas e secas foram moídas em moinho de facas (Tecnal, modelo TE-648, Piracicaba - SP, Brasil).

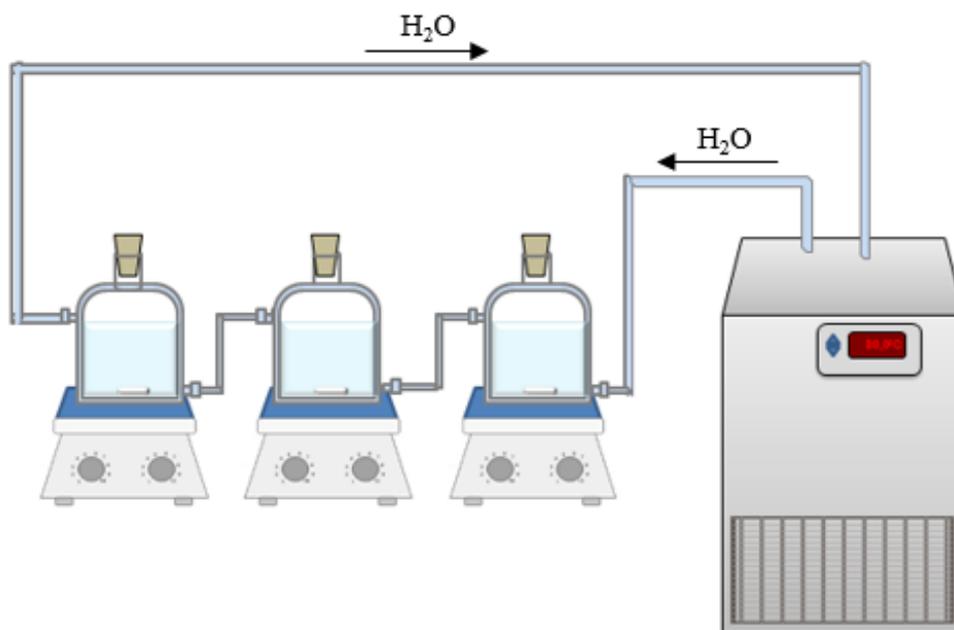
*Acondicionamento e armazenamento:* As penas moídas foram embaladas em saco plástico de polietileno de baixa densidade (PEBD) de fechamento hermético e armazenadas em freezer a  $-16 \pm 2$  °C.

#### 4.3.2 Dissolução química das penas

A dissolução química foi realizada através da pesagem de diferentes percentuais de substrato (penas moídas), adicionadas em água destilada (até volume total de 100mL), sulfito de sódio e de hidróxido de sódio (concentração de 0,08 molar), obtendo-se uma solução em pH 12,9. As concentrações de substrato e de sulfito de sódio estão detalhadas em planejamento experimental da Tabela 1.

As misturas foram aquecidas em um sistema montado com três reatores encamisados (capacidade individual de 300 mL) (Figura 4), a temperatura controlada por circulação de água proveniente de banho termostatizado (Quimis; modelo 0214M2; Diadema - SP, BR) e agitadas continuamente (100 rpm) durante 12 h por agitadores magnéticos.

Figura 4 - Dissolução química das penas em sistema de reatores encamisados.



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Foram realizados testes preliminares para avaliar as condições de dissolução (pH, tempo, temperatura, concentração do substrato, concentrações dos reagentes). Estes foram realizados em meio redutor básico, utilizando como referência informações contidas em trabalhos de Ramnani, Gupta, (2007); Eslahi, Dadashian, Nejad, (2013). Após os testes, ensaios para a determinação das melhores condições de dissolução foram realizados através de um delineamento composto central rotacional (DCCR)  $2^3$  apresentado na Tabela 1. O delineamento foi utilizado para estudar os efeitos das variáveis: concentração de substrato, temperatura e concentração de sulfito de sódio, sobre a dissolução completa das penas em meio aquoso, com o grau de hidrólise GH (%) como variável resposta.

O ensaio no qual se obteve os melhores resultados, foi denominado como “melhor condição de dissolução”, sendo este escolhido para ser utilizado para as demais etapas de hidrólise enzimática e de aplicação de ultrassom e micro-ondas.

Tabela 1 - Planejamento fatorial  $2^3$  para avaliar os efeitos das variáveis concentração de substrato, temperatura e concentração de Sulfito de Sódio na dissolução das penas.

Ensaio	Codificado			Real		
				Variáveis independentes		
				C substrato (%)	T (°C)	C Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> (M)
1	-1,00	-1,00	-1,00	2,0	70,0	0,06
2	-1,00	-1,00	1,00	2,0	70,0	0,10
3	-1,00	1,00	-1,00	2,0	90,0	0,06
4	-1,00	1,00	1,00	2,0	90,0	0,10
5	1,00	-1,00	-1,00	4,0	70,0	0,06
6	1,00	-1,00	1,00	4,0	70,0	0,10
7	1,00	1,00	-1,00	4,0	90,0	0,06
8	1,00	1,00	1,00	4,0	90,0	0,10
9	-1,68	0,00	0,00	1,32	80,0	0,08
10	1,68	0,00	0,00	4,68	80,0	0,08
11	0,00	-1,68	0,00	3,0	63,2	0,08
12	0,00	1,68	0,00	3,0	96,8	0,08
13	0,00	0,00	-1,68	3,0	80,0	0,05
14	0,00	0,00	1,68	3,0	80,0	0,11
15	0,00	0,00	0,00	3,0	80,0	0,08
16	0,00	0,00	0,00	3,0	80,0	0,08
17	0,00	0,00	0,00	3,0	80,0	0,08

Fonte: Elaborada pela autora (2020).

#### 4.3.3 Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática foi procedida por incubação em sistema de reatores encamisados (Figura 4), sob agitação a 60 rpm e temperatura controlada por água recirculada em banho termostaticado (Quimis; modelo 0214M2; Diadema, SP, BR). A agitação foi aplicada com intuito de auxiliar a homogeneização do meio, substrato, enzimas e reagentes, evitar variação na temperatura e no pH dentro do reator.

Os ensaios experimentais da hidrólise enzimática foram realizados de acordo com os parâmetros estabelecidos no Quadro 3, seguindo o delineamento composto central rotacional

2<sup>2</sup> apresentado na Tabela 2 para estudar o efeito das variáveis concentração enzima/substrato (E/S) e temperatura, sobre a resposta grau de hidrólise (GH).

O pH dos solubilizados provenientes da dissolução química foi ajustado com solução de HCl (3 N) para 10,6. Em seguida, a enzima foi adicionada e a reação monitorada a cada duas horas através do grau de hidrólise, método descrito no item 4.4.1. Ao final do processo foi feito o resfriamento e armazenamento do hidrolisado em tubos tipo Falcon de 50 mL à temperatura de  $-16 \pm 2$  °C até o momento das análises, quando então foram filtrados segundo método descrito no item 4.3.5 (filtração dos hidrolisados com membrana).

Quadro 3 - Parâmetros da hidrólise enzimática: concentração de substrato, tempo, pH, concentração de enzima e temperatura.

Enzima	Concentração substrato (%)	Tempo (h)	pH	Concentração E/S (%)	Temperatura (°C)
Savinase®	4,0	10	10,6	5,0 a 23,1	45,0 a 55,0

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Tabela 2 - Planejamento fatorial 2<sup>2</sup> para avaliar os efeitos das variáveis relação enzima/substrato e temperatura na hidrólise enzimática da queratina de penas de frango com savinase®.

Ensaio	Codificado		Real	
			Variáveis independentes	
			E/S (%)	T (°C)
1	-1,00	-1,00	5,0	45,0
2	-1,00	1,00	5,0	55,0
3	1,00	-1,00	20,0	45,0
4	1,00	1,00	20,0	55,0
5	-1,41	0,00	1,9	50,0
6	1,41	0,00	23,1	50,0
7	0,00	-1,41	12,5	43,0
8	0,00	1,41	12,5	58,0
9	0,00	0,00	12,5	50,0
10	0,00	0,00	12,5	50,0
11	0,00	0,00	12,5	50,0

Fonte: Elaborada pela autora (2020).

O ensaio no qual se obteve o melhor resultado de hidrólise enzimática, foi escolhido para as demais etapas e, após a aplicação do ultrassom e das micro-ondas, foi executado com os mesmos valores das variáveis definidas por ter estas melhores condições. Assim, ao final das etapas, obtiveram-se 3 hidrolisados: hidrolisado enzimático (1ª etapa) sem aplicação de pré-tratamento (EZ), hidrolisado com pré-tratamento com ultrassom (US) e hidrolisado com pré-tratamento com micro-ondas (MW).

#### 4.3.4 Pré-tratamento enzimático: aplicação das tecnologias de ultrassom e micro-ondas

O ultrassom e as micro-ondas foram aplicados como pré-tratamento nas soluções após a etapa química de dissolução das penas. As penas foram processadas na melhor condição de dissolução, ao término desta o pH foi ajustado em 10,6 (pH para a enzimólise com a savinase®) antes dos pré-tratamentos.

Em seguida, os pré-tratamentos dos solubilizados com sonda de ultrassom e micro-ondas foram aplicados como descrito a seguir:

*Ultrassom:* 50 mL da solução de penas dissolvidas, obtidos na melhor condição, foram transferidos para béqueres plásticos de 100 mL e sonicados em sonicador ultrassônico (Eco-sonics, modelo QR500, Indaiatuba, SP, Brasil), frequência e potência ultrassônica de 20 kHz e de 500W, respectivamente (JAMBRAK et al. 2014; HOLKAR et al., 2016) A sonda com micropona de titânio de 4 mm de diâmetro, foi inserida na parte central do recipiente a uma profundidade de 0,5 cm dentro da solução. As condições operacionais, nos níveis inferiores e superiores de potência (200 e 400W) e de tempo (5 e 20 min), foram executadas de acordo com o planejamento experimental composto central rotacional 2<sup>2</sup> apresentado na Tabela 3. Durante a aplicação do ultrassom, o recipiente foi imerso em banho de gelo para que a temperatura da solução não excedesse 60° C (Figura 5).

Figura 5 - Pré-tratamento da solução de pena de frango em sonicador ultrassônico.



Fonte: Arquivo pessoal da autora (2020).

Tabela 3 - Planejamento fatorial  $2^2$  para os pré-tratamentos com ultrassom e micro-ondas nas soluções de penas dissolvidas.

Ensaio	Codificado	Real		
		Variáveis independentes		Tempo (min)
		Potência (W)		
1	-1,00	-1,00	200,0	5,0
2	-1,00	1,00	200,0	20,0
3	1,00	-1,00	400,0	5,0
4	1,00	1,00	400,0	20,0
5	-1,41	0,00	160,0	12,5
6	1,41	0,00	442,0	12,5
7	0,00	-1,41	300,0	1,9
8	0,00	1,41	300,0	23,1
9	0,00	0,00	300,0	12,5
10	0,00	0,00	300,0	12,5
11	0,00	0,00	300,0	12,5

Fonte: Elaborada pela autora (2020).

*Micro-ondas:* 20 mL da solução de penas dissolvidas foram transferidos para tubos vial de um reator de micro-ondas (Anton Paar, modelo monowave 400). O pré-tratamento foi realizado variando potência e tempo de processo, conforme planejamento experimental mostrado na Tabela 3. As temperaturas reais das soluções de reação foram medidas durante a

irradiação com micro-ondas, pelo equipamento, no qual foi programada a temperatura máxima de 70 °C, considerando as condições amenas de temperatura estabelecidas para esta pesquisa.

As amostras pré-tratadas em ultrassom e micro-ondas foram para a etapa de hidrólise enzimática seguindo os parâmetros do ensaio escolhido por ter as melhores condições de hidrólise enzimática.

#### 4.3.5 Filtração dos hidrolisados com membrana

Com objetivo de separar impurezas e permear aminoácidos e peptídeos, os hidrolisados obtidos no final da enzimólise foram neutralizados para pH 7,5 com HCl (5 N) e em seguida foram filtrados. A microfiltração foi realizada em sistema de filtração perpendicular pressurizado a 2 bar, com célula de inox, agitação magnética e membrana PVDF de 0,2 µm (MV020, Microdyn Nadir), com área filtrante de  $1,02 \times 10^{-3} \text{ m}^2$ , previamente hidratada em água destilada por 20 min. Os hidrolisados filtrados foram congelados à temperatura de  $-16 \pm 2 \text{ °C}$  e, posteriormente, destinados à análise de espectrometria de massa e demais análises. Os hidrolisados filtrados foram assim denominados:

EZ - Hidrolisado enzimático (1ª etapa) sem tratamento ultrassom/micro-ondas;

US - Hidrolisado com pré-tratamento de ultrassom;

MW - Hidrolisado com pré-tratamento de micro-ondas.

### 4.4 ACOMPANHAMENTO DO PROCESSO DE HIDRÓLISE E CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROLISADOS

#### 4.4.1 Grau de hidrólise (GH)

A evolução das etapas de dissolução química e hidrólise enzimática foi monitorada através da retirada periódica (em tempos de 2 em 2 horas) de alíquotas do meio de incubação para avaliar o grau de hidrólise (GH).

O GH foi medido pelo método de Sorensen (AOAC, 2012), baseado na titulação com formol (formaldeído) para determinar o Nitrogênio  $\alpha$ -amino (NA). O formol em excesso se combina facilmente com os grupos amino livres dos aminoácidos, que nesta reação são titulados com solução alcalina em presença de fenolftaleína como indicador. O amino grupo do aminoácido produz um derivado do metileno com o formol e perde suas propriedades catiônicas, enquanto o grupo carboxil do aminoácido é desbloqueado e pode ser titulado com a

base na presença de fenolftaleína. O número de grupos carboxil liberados é equivalente ao número de ligações dos aminoácidos com formol.

A mistura reativa formol-fenolftaleína é obtida através da adição 1 mL de fenolftaleína 0,05 % (solvente álcool etílico 50 %) em formol (CH<sub>2</sub>O 37 %) até um volume final de 50 mL. O pH desta solução foi ajustado a pH 8,5 com solução de Ba(OH)<sub>2</sub> 0,2N imediatamente antes da utilização. Em seguida, adicionou-se 10 mL do reagente de formaldeído à 10 mL da solução de hidrolisado sob investigação (com pH ajustado para 8,5) e a mistura foi agitada e titulada com uma solução de Ba(OH)<sub>2</sub> 0,2 N até o ponto final (pH 8,5). Registrou-se os volumes necessários de soluções de Ba(OH)<sub>2</sub>. Um branco foi preparado com volume equivalente de água destilada fervida e solução de formol neutralizada.

A titulação direta foi tomada como uma medida dos aminoácidos e peptídeos presentes, sendo calculado o NA através da seguinte equação (1):

$$NA = \frac{(V_{Ba(OH)_2} - V_{Branco}) \cdot f \cdot N_{Ba(OH)_2} \cdot 0,014 \cdot 100}{P} \quad (1)$$

Onde: NA - Nitrogênio  $\alpha$ -amino

$V_{Ba(OH)_2}$  - volume (mL) de Ba(OH)<sub>2</sub> 0,2 N gasto na titulação da amostra

$V_{Branco}$  - volume (mL) de solução de Ba(OH)<sub>2</sub> 0,2 N gastos na titulação do branco

f - fator da solução de Ba(OH)<sub>2</sub> 0,2 N

$N_{Ba(OH)_2}$  - normalidade da solução de Ba(OH)<sub>2</sub> (= 0,2 N)

P- peso da amostra em gramas na alíquota

O GH é calculado usando a relação entre os grupos amino livres formados durante o processo de hidrólise e o nitrogênio total, segundo a Equação 2:

$$\%GH = \frac{\text{Nitrogênio } \alpha\text{-amino (NA)}}{\text{Nitrogênio total (NT)}} \cdot 100 \quad (2)$$

O Nitrogênio Total (NT) foi determinado pelo método de Kjeldahl, 928.08, AOAC, (2012).

#### 4.4.2 Caracterização do hidrolisado de queratina de penas de frango

Para caracterização do hidrolisado de queratina de pena de frango foram realizadas as análises, assim agrupadas (Quadro 4):

Quadro 4 - Propriedades nutricionais, bioativas, estruturais, funcionais, físico-químicas e sensoriais do hidrolisado.

PROPRIEDADES	ANÁLISES
Nutricionais e bioativas	Quantificação de proteína, umidade, cinzas e matéria seca
	Perfil peptídico
	Digestibilidade <i>in vitro</i> de proteínas
	Atividade antioxidante
Estruturais	Tamanho de partículas
	Características estruturais (FTIR)
Funcionais	Solubilidade proteica (SP)
	Capacidade emulsificante (CE)
	Estabilidade da emulsão (EE)
Físico-químicas e sensoriais	pH
	Densidade
	Viscosidade
	Índice de refração
	Cor

##### 4.4.2.1 Quantificação de proteína, umidade, cinzas e nutrientes em base seca

A quantidade de proteína do hidrolisado após processo foi determinada, através da metodologia de Lowry et al. (1951), usando albumina sérica bovina (CAS 9048-46-8, Sigma-Aldrich) como padrão.

O teor de umidade e de cinzas dos hidrolisados foi determinado pelos métodos nº 950.46 e 920.153, descritos nos procedimentos analíticos da AOAC (2012). O percentual de nutrientes em base seca foi determinado subtraindo-se o percentual de umidade. Os lipídeos foram calculados por diferença dos 100% pelo somatório dos demais micronutrientes.

#### 4.4.2.2 Perfil peptídico

O perfil peptídico (massa molecular, distribuição quanto ao tamanho dos peptídeos: di-, tri- e oligopeptídeos) foi determinado por cromatografia líquida de interação hidrofóbica com acoplamento a ionização de massas por nebulização e analisador QTOF (HILIC - ESI - QTOF - MS).

#### 4.4.2.3 Digestibilidade *in vitro* das proteínas

A digestibilidade *in vitro* foi avaliada através do método descrito por Tiwary e Gupta (2012), com modificações, em que 1 mL do hidrolisado foi diluído em 7,5 mL de HCl 0,1 N (pH foi ajustado entre 1,5 e 2,0), com adição  $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  de pepsina e incubação da mistura a  $37^\circ\text{C}$  durante 2 h. Após isso, o pH foi ajustado para 8 por adição de hidróxido de sódio 2 M, sendo adicionada tripsina  $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , e a mistura reacional incubada a  $37^\circ\text{C}$  durante 16 h. Após os tratamentos com pepsina e tripsina, as amostras foram centrifugadas a 6000 g e os peptídeos solúveis no sobrenadante foram medidos a 660 nm. A digestibilidade percentual foi calculada pela razão entre proteína total liberada após digestão de 1 mL de amostra e a proteína total de 1 mL da amostra antes da digestão. Paralelamente, foi preparado um branco com água destilada e demais reagentes e a curva-padrão foi feita com albumina sérica bovina.

#### 4.4.2.4 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos hidrolisados de pena foi avaliada por duas metodologias de captura de radicais: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil ( $\text{DPPH}^{\bullet}$ ) e 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) ( $\text{ABTS}^{\bullet}$ ). Os ensaios foram realizados em triplicata, a absorbância foi medida em espectrofotômetro UV-Vis (Quimis, Q8898U2M5). O ácido gálico foi utilizado como antioxidante padrão. Os ensaios foram realizados em triplicata.

A análise de inibição do radical  $\text{DPPH}^{\bullet}$ , foi realizada conforme metodologia de Brand-Williams et al. (1995), que se baseia na captura do radical por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorbância a 515 nm. Para a análise, foram feitas diferentes diluições dos hidrolisados, e alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram transferidas para tubos de ensaio com 3,9 mL de solução metanólica 0,06 mM do radical  $\text{DPPH}^{\bullet}$  (Absorbância  $1,0 \pm 0,1$ ). As misturas reativas foram homogeneizadas e incubadas por 30 min em temperatura de  $25^\circ\text{C}$ , ao abrigo de luz, até medida da absorbância a 515 nm. Metanol foi utilizado como branco e o

controle foi constituído de água destilada e DPPH<sup>+</sup> sem a adição de antioxidantes. A porcentagem de inibição do radical DPPH<sup>+</sup> ou porcentagem de atividade antioxidante foi calculada tendo como referência a absorbância do controle de acordo com a Equação 3:

$$\text{Porcentagem de atividade antioxidante (\% AAO)} = \frac{Ac-As}{Ac} \cdot 100 \quad (3)$$

Onde: Ac é a absorbância do controle e As a absorbância da amostra.

A concentração de hidrolisado necessária para a inibição de 50% do radical DPPH (EC<sub>50</sub>) foi determinada através de gráfico plotado com as concentrações de hidrolisado versus suas respectivas atividades antioxidantes (% AAO).

A metodologia de Re et al. (1999) com algumas modificações foi utilizada para determinação da atividade antioxidante frente ao radical catiônico ABTS<sup>•+</sup>.

Inicialmente foi preparada uma solução - mãe de ABTS com concentração final 7 mM (3,84 mg até 1 mL com água ultrapura). Em seguida foi obtida a solução do radical catiônico ABTS<sup>•+</sup>, adicionando 17,6 µL de solução de persulfato de potássio (140 mM) a cada 1 mL da solução - mãe de ABTS. A mistura foi mantida na ausência de luz por 16 horas a temperatura ambiente de 29 °C. Após isto, esta foi diluída com álcool metílico até obter absorbância entre 0,70 nm ± 0,05 no comprimento de onda de 734 nm. Utilizou-se o álcool metílico como branco.

Foram feitas 5 diluições das amostras e, em penumbra, à cada 30 µL de diluição, adicionou-se 3 mL da solução do radical ABTS<sup>•+</sup>, homogeneizando-se a mistura em agitador de tubos tipo vortex. A seguir, as misturas reativas foram incubadas por 20 min, protegidas da luz e logo em seguida foi realizada a leitura da absorbância a 734 nm. Um controle foi constituído de água destilada e solução do radical ABTS<sup>•+</sup>. Foi verificado se as amostras absorviam em 734 nm misturando 30 µL de amostra e 3 mL de metanol. Como isso não aconteceu, não foi necessário fazer um branco da amostra.

A atividade de eliminação do radical ABTS<sup>•+</sup> e o EC<sub>50</sub> foram determinados pela mesma equação da atividade antioxidante frente ao radical DPPH<sup>+</sup> (Equação 3) e pela plotagem das concentrações de hidrolisado nas diversas diluições versus suas respectivas % AAO.

#### 4.4.2.5 Propriedades estruturais

A distribuição do tamanho de partículas foi determinada em Dispersion Analyser Lumisizer® (L.U.M. GmbH, LS 611) para os hidrolisados enzimáticos finais, à 25 °C e 4000 rpm. Também foi realizada a análise com fim de investigar a ação do ultrassom no tamanho das partículas do solubilizado químico, este foi analisado imediatamente após a etapa química, sendo também submetido à ultrassom (50 mL; 450 W; 12,5 min) e analisado.

Para investigar modificações qualitativas na estrutura da queratina hidrolisada, foram realizadas análises de características estruturais das penas e dos hidrolisados enzimáticos, com e sem pré-tratamentos de ultrassom e micro-ondas. Os hidrolisados foram secos em estufa a 50 °C até peso constante e passaram do estado líquido para sólido. Em seguida, as amostras foram analisadas por FTIR.

As amostras foram submetidas à espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), com medida de transmitância por reflexão total atenuada (ATR), em espectrômetro Modelo AGILENT TECHNOLOGIES - Cary 660 FTIR, na região de número de ondas de 4000 à 400 cm<sup>-1</sup>. O software Origin 8.0 foi utilizado para elaboração e análise dos espectros.

Com o fim de avaliar as propriedades tecno-funcionais do hidrolisado foram analisadas: solubilidade da proteína, capacidade emulsificante e estabilidade de emulsão.

#### 4.4.2.6 Solubilidade proteica (SP)

Foi utilizado o método de Pralea et al. (2011), com algumas modificações. A solubilidade proteica foi determinada usando 1 mL de amostra de hidrolisado de proteína, adicionado em 10 mL de água destilada e, posteriormente, o pH da mistura foi ajustado para 2, 4, 6 e 8 com HCl 1N ou NaOH 1N. Posteriormente, a mistura foi agitada a temperatura aproximada de 30 °C durante 20 min e centrifugada à 6000 x g durante 15 min.

A solubilidade das proteínas, SP, foi calculada utilizando a Equação 4 em que PS é o teor de proteína no sobrenadante e PT é o teor total de proteína na amostra:

$$SP = \frac{PS}{PT} \cdot 100 \quad (4)$$

Os teores de proteína no sobrenadante e a proteína total foram determinados pelo método de Lowry et al. (1951).

#### 4.4.2.7 Capacidade emulsificante (CE)

A análise da capacidade emulsificante do hidrolisado foi realizada conforme procedimento descrito por De Kanterewicz et al. (1987), onde a CE é a quantidade máxima de óleo que pode ser dispersa em fase aquosa. Assim, o hidrolisado proteico aquoso e óleo de soja comercial foram combinados em diferentes proporções mantendo o volume total igual a 50 mL. Antes da adição de óleo, a solução de proteína foi agitada por um tempo de três min, utilizando-se o homogeneizador Ultra-Turrax (IKA, T25) à velocidade de 6.000 rpm. Em seguida o óleo foi adicionado aos poucos (de 1 em 1 mL), até o ponto onde ocorreu a inversão das fases com colapso da emulsão, visualizada pela separação de fases, mudança na cor e viscosidade.

Durante o experimento, as emulsões foram mantidas em banho de gelo para evitar o aquecimento da amostra, com manutenção da temperatura entre 4 e 5 °C. A capacidade de emulsificação foi relacionada à quantidade de óleo adicionada até alcançar o ponto de inversão ou colapso, sendo expressa em mL de óleo adicionado/g de proteína.

#### 4.4.2.8 Estabilidade da emulsão (EE)

A EE foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Acton e Saffle (1970) com algumas adaptações. As emulsões foram preparadas com 50 mL de óleo de soja e 50 mL de dispersões 1 % de proteína (volume de hidrolisado e água ajustado para resultar nesta concentração), a pH 7,0, homogeneizadas a 6000 rpm em homogeneizador Ultra-Turrax (IKA, T25) por três minutos em banho de gelo, com manutenção da temperatura entre 4 e 5 °C. A umidade da emulsão recém-preparada foi determinada pela metodologia 950.46 (AOAC, 2012).

Alíquotas de 20 mL foram colocadas em tubos falcon e deixadas em repouso por 24 horas a 37 °C ± 2 °C. Após 24 horas a 37 °C. Após este tempo, 5 mL da amostra da fase inferior do tubo foi removida com pipeta e a sua umidade foi determinada. A estabilidade da emulsão para cada amostra foi determinada com base na variação do percentual de umidade (U) após 24 horas, onde  $EE (\%) = (100 - U_{24\text{ h}} / 100 - U_{\text{inicial}}) \times 100$ .

#### 4.4.2.9 pH

As determinações de pH foram realizadas em pHmetro digital microprocessado (Quimis, modelo Q400 MT, São Paulo, Brasil). O aparelho foi calibrado com soluções tampão de pH 4,0; 7,0 e  $10,0 \pm 0,02$ . O pH foi medido nas amostras a temperatura de 25 °C.

#### 4.4.2.10 Densidade

A densidade absoluta foi medida por picnometria, em picnômetro de vidro de 10 mL. A temperatura do líquido foi estabilizada em banho à 25 °C imediatamente antes da realização da medida da massa em balança analítica (Shimadzu, AUY220, Kyoto, Japão). O valor foi calculado pela relação:  $d = m/v$ , onde “d” equivale à densidade, “m” à massa e “v” ao volume, sendo expressa em  $g \cdot mL^{-1}$ .

#### 4.4.2.11 Viscosidade

A medida desta propriedade reológica foi determinada no hidrolisado a 22 °C usando um reômetro rotacional (Thermo Scientific, MARS HAKE, Germany), com prato-prato configurado com gap de 1 mm, tempo de 0 a 500 s. Os dados foram emitidos em programa Haake rheowin data manager e plotados no Origin 8.5.

#### 4.4.2.12 Índice de refração

O índice de refração foi determinado à 25 °C, utilizando refratômetro digital portátil (modelo AR200, Reichert).

#### 4.4.2.14 Cor

A cor dos hidrolisados finais foi determinada através de Espectrofotometria, fazendo-se a varredura da absorção da luz na região do visível (380 a 780 nm) em espectrofotômetro UV-Vis (Quimis, Q8898U2M5).

#### 4.4.3 Análise estatística

A análise dos resultados para otimização do processo foi realizada através da ferramenta estatística Design of experiments (DOE) e metodologia de Superfície de Resposta (MSR) (RODRIGUES, LEMMA, 2015) que permitiu a predição de modelos avaliados pela Análise de Variância (ANOVA) e pelo p-valor, a níveis de significância de 5% ou 10% com uso do software Statistica 7.0. Médias e desvios padrão foram calculados pelo software Excel (Microsoft, versão 2013). O teste proposto por Tukey (1953), foi utilizado para complementar a análise das médias.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DAS PENAS

Os percentuais de umidade, cinzas, proteínas e lipídeos das penas estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Composição centesimal (média e desvio padrão) das penas de frango limpas e secas.

<b>Macronutriente</b>	<b>Valor médio (%)</b>	<b>Valor médio (Fakhfakh et al., 2011) (%)</b>
Proteínas	84,28 ± 3,91	85,31 ± 0,43
Umidade	7,98 ± 0,24	6,07 ± 0,87
Lipídeos	8,08 ± 0,39	2,00 ± 0,7
Cinzas	0,42 ± 0,02	0,69 ± 0,08

Fonte: Elaborada pela autora (2020).

O teor de proteínas na amostra foi de 84,28 %, sendo o componente majoritário das penas. Este resultado corrobora com o percentual de proteínas reportado na literatura (85,31 %) por Fakhfakh et al. (2011). Também foram determinados os teores de umidade (7,98 %), lipídeos (8,08 %) e cinzas (0,42 %). O teor de lipídeos foi considerável, devido à utilização das penas inteiras com o cálcio (mais gorduroso) e sem processo específico para desengorduramento. Estes valores estão alinhados com os encontrados na literatura onde a umidade pode variar entre 6 e 13 %, lipídeos de 2 a 10 %, minerais em média até 1 %. Estas

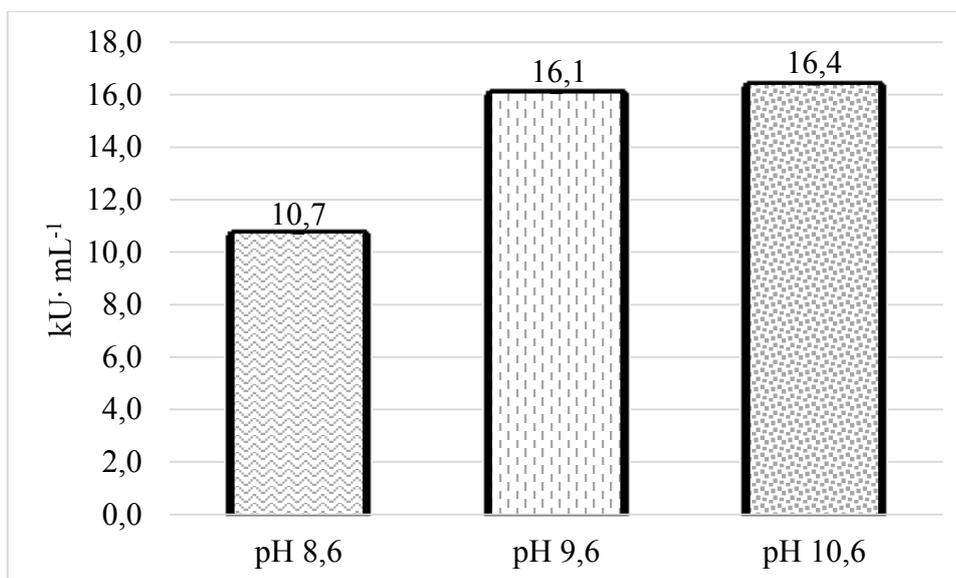
variações podem estar relacionadas ao tempo de secagem, processo de limpeza e desengorduramento, e com a própria constituição dos animais (FAKHFAKH et al., 2011; TESFAYE et al., 2017).

O percentual de proteínas nas penas (84,28 %) foi utilizado para os cálculos do grau de hidrólise (GH). Destaca-se que o teor de proteínas nas penas é muito relevante, e a queratina majoritária destas proteínas (GUPTA, SHARMA, 2016), sendo alvo deste estudo, a qual foi extraída das penas e hidrolisada para obtenção dos peptídeos analisados.

## 5.2 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA SAVINASE<sup>®</sup>

Na Figura 6 está representado o resultado do ensaio quantitativo da atividade proteolítica da enzima Savinase<sup>®</sup> determinada em três pH's distintos: 8,6; 9,6 e 10,6, usando azocaseína como substrato padrão.

Figura 6 - Atividade enzimática da Savinase<sup>®</sup> em pH 8,6; 9,6 e 10,6.



Fonte: Elaborada pela autora (2020). \*O desvio padrão foi menor do que 5%, ocultando barras de erro. \*\* U · mL<sup>-1</sup> é atividade proteolítica específica da enzima, definida como a Unidade de atividade (U) por mL de solução enzimática.

Observa-se (Figura 6) que a atividade enzimática da savinase foi maior (16,4 kU · mL<sup>-1</sup>) para o pH 10,6. De acordo com o fabricante (NOVOZYMES, 2016), o pH ótimo encontra-se entre 8 e 10.

A atividade é uma medida da capacidade de ação enzimática que é claramente de interesse para uso de enzimas em um processo. O fabricante declara uma atividade enzimática

de 16 kNPU (Novo Protease Unit), equivalente à 16 kAU (Anson Unit), dado que diz que 1 NPU = 1 AU. Os valores obtidos no presente trabalho não podem ser diretamente comparados com a declaração do fabricante, uma vez que não são dadas informações da metodologia, do substrato e das condições de ensaio utilizados.

A unidade Anson é uma unidade de atividade fora do padrão e esta unidade está gradualmente caindo em desuso. As enzimas geralmente são comercializadas em termos de sua atividade, sendo a medida comum feita em unidade de atividade (U), que é definida como a capacidade da enzima de catalisar a transformação de 1 micromole do substrato por minuto em condições padrão para ela recomendadas (sendo U/mL esta capacidade por mL de solução enzimática). Há um grande problema com essas definições de atividade, devido a noção bastante vaga de "condições padrão". Estas referem-se às condições ideais, especialmente no que diz respeito ao pH, temperatura, concentração de substrato, força iônica (CHAPLIN, 2014). Essas condições padrão, assim denominadas, variam tanto entre laboratórios quanto entre fornecedores. Eles também dependem da aplicação específica em que a enzima deve ser usada.

Assim, considerando-se todas as observações feitas, a faixa de pH ótimo dada pelo fabricante, os resultados da atividade enzimática da savinase em diferentes pH, e experiências práticas prévias do grupo de estudo, o pH 10,6 foi utilizado para os ensaios com a savinase<sup>®</sup>.

### 5.3 DISSOLUÇÃO DAS PENAS

As respostas do grau de hidrólise gerado pelo planejamento experimental delineado (Tabela 5) foram usadas para estabelecer as melhores condições da etapa química de dissolução. Para avaliar o GH, amostras foram coletadas e analisadas em intervalos de 2 h durante 12 (doze) horas.

Tabela 5 - Grau de hidrólise ao longo do tempo de dissolução das penas de frango.

Ensaio	Conc. Subst. (%)	T (°C)	Conc. Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> (M)	Grau de Hidrólise (%)					
				2h	4h	6h	8h	10h	12h
1	2,0 (-1)	70,0 (-1)	0,06 (-1)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	2,0 (-1)	70,0 (-1)	0,10 (1)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3	2,0 (-1)	90,0 (1)	0,06 (-1)	0,0	0,0	6,3	8,4	16,8	21,0
4	2,0 (-1)	90,0 (1)	0,10 (1)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>5</b>	<b>4,0 (1)</b>	<b>70,0 (-1)</b>	<b>0,06 (-1)</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>1,1</b>	<b>2,1</b>	<b>4,2</b>	<b>6,3</b>
6	4,0 (1)	70,0 (-1)	0,10 (1)	0,0	0,0	0,0	1,1	1,1	3,2
7	4,0 (1)	90,0 (1)	0,06 (-1)	5,3	12,6	20,0	21,0	22,1	26,3
8	4,0 (1)	90,0 (1)	0,10 (1)	0,0	0,0	3,2	5,3	14,7	15,8
9	1,32 (-1,68)	80,0 (0)	0,08 (0)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
10	4,68 (1,68)	80,0 (0)	0,08 (0)	0,0	0,0	3,7	8,2	10,1	11,0
11	3,0 (0)	63,2 (-1,68)	0,08 (0)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
12	3,0 (0)	96,8 (1,68)	0,08 (0)	0,0	5,6	12,6	19,6	26,6	26,6
13	3,0 (0)	80,0 (0)	0,05 (-1,68)	0,0	1,4	7,0	14,0	16,8	21,0
14	3,0 (0)	80,0 (0)	0,11 (1,68)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
15	3,0 (0)	80,0 (0)	0,08 (0)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,4
16	3,0 (0)	80,0 (0)	0,08 (0)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
17	3,0 (0)	80,0 (0)	0,08 (0)	0,0	0,0	1,4	1,4	2,8	5,6

Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Os resultados da Tabela 5 foram analisados estatisticamente pela ANOVA (análise de variância), e os resultados estão na Tabela 6. O coeficiente de determinação para o modelo ajustado foi de 0,898, indicando que o modelo obtido pode explicar 89,8 % da variação dos dados observados para a resposta grau de hidrólise.

A partir destes resultados, foi montado um modelo empírico codificado para o grau de hidrólise em função das variáveis investigadas, sem aquelas não significativas ( $\alpha = 0,10$ ), capaz de prever os dados experimentais da dissolução mostrado na Equação 5.

$$GH(\%) = 5,9 + 3,6 x_1 + 7,2 x_2 + 2,8 x_2^2 - 5,1 x_3 - 3,5 x_2x_3 \quad (5)$$

Onde:  $x_1$  - Concentração de substrato

$x_2$  - Temperatura

$x_3$  - Concentração de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>

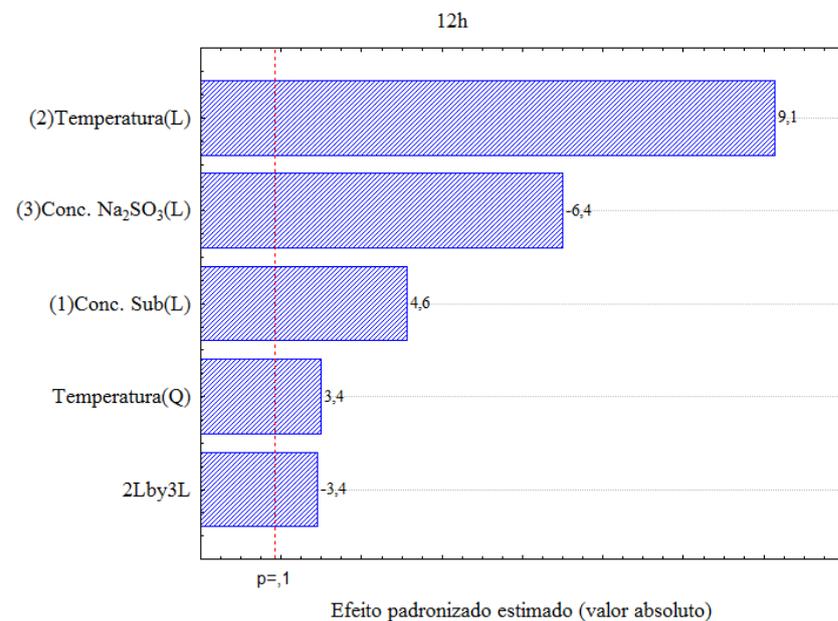
Tabela 6 - Análise de variância (ANOVA) do planejamento experimental para validação do modelo matemático empírico que descreve o grau de hidrólise em 12 h de dissolução das penas.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados (SQ)	Quadrados Médios (QM)	F Calculado
Regressão	5	1447,4	289,5	19,4
Resíduos	11	164,3	14,9	
Total	16	1611,7		

Fonte: Elaborada pela autora (2020).  $R^2 = 89,8 \%$ ;  $F_{5, 11; 0,10} = 2,45$

Na Figura 7 (diagrama de Pareto) são mostrados os efeitos e sua intensidade do maior para o menor, em que as três variáveis lineares estudadas mostraram efeito significativo ( $\alpha = 0,10$ ) no grau de hidrólise, com maior efeito (positivo) da temperatura, seguido do efeito negativo da concentração de sulfito e do efeito positivo da concentração de substrato.

Figura 7 - Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis de processo no grau de hidrólise (GH) em 12 h de dissolução das penas de frango.

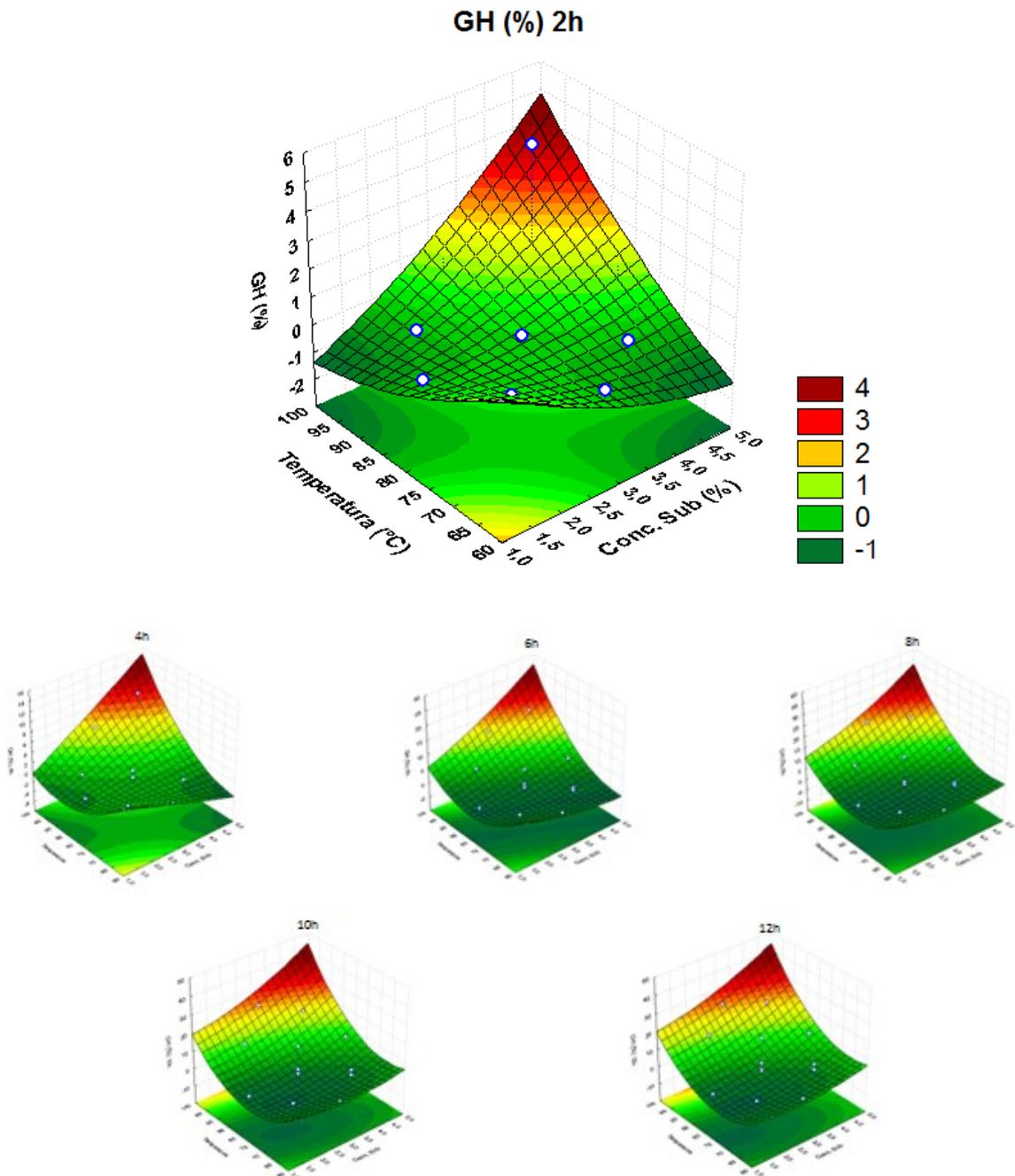


Fonte: Elaborada pela autora (2020).

A Figura 8 corresponde aos resultados dos ensaios de dissolução nos tempos 2, 4, 6, 8, 10 e 12h. Todas foram geradas a partir de modelos empíricos válidos. É possível observar pelas superfícies de resposta o mesmo comportamento das variáveis, independentemente do tempo,

onde o grau de hidrólise aumentou com o aumento da concentração de substrato e a temperaturas mais elevadas.

Figura 8 - Superfícies de resposta para o grau de hidrólise em função da temperatura e da concentração de substrato para os tempos de 2h, 4h, 6h, 8h, 10h e 12h de dissolução.



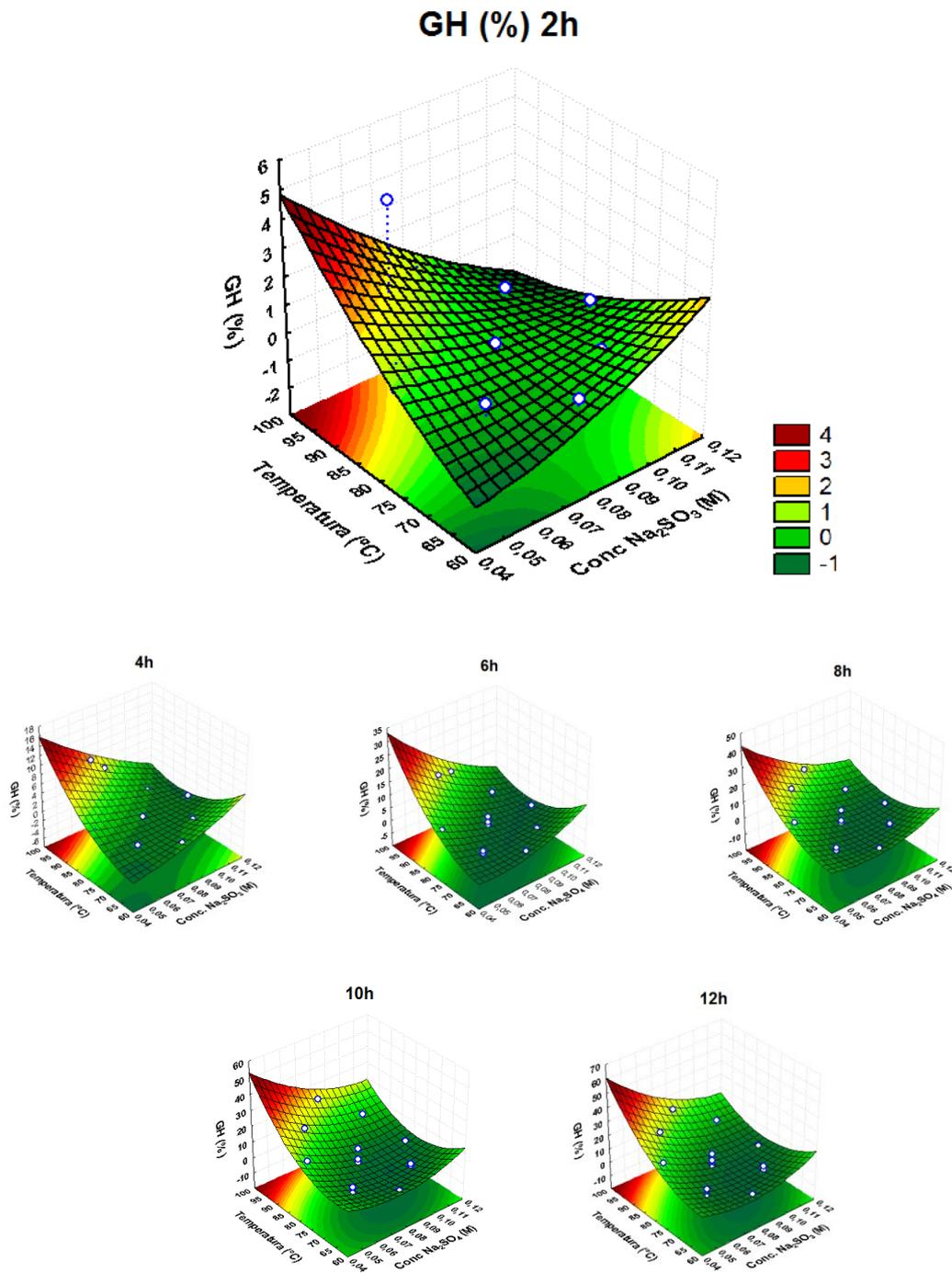
Com os resultados expostos na Tabela 5 e as superfícies de resposta (Figura 8), pode-se observar que o grau hidrólise foi maior com maior concentração de substrato (nível superior 4%). É válido justificar o motivo de não terem sido utilizados maiores percentuais de substrato,

dado que o grau de hidrólise foi maior com maiores percentuais de penas. A concentração superior (4%) foi utilizada como máxima pois em testes individuais, onde tentou-se incorporar penas trituradas na solução em proporções maiores, esta incorporação foi difícil tendo em vista a característica volumosa e pouco densa deste substrato.

As superfícies de resposta apresentadas nas Figura 9 mostram o grau de hidrólise em função da temperatura e da concentração de sulfito de sódio nos tempos de dissolução (2, 4, 6, 8, 10 e 12h). É possível observar o mesmo perfil das superfícies de resposta em todos os tempos de hidrólise e, se observa uma relação inversa onde altas temperaturas e baixa concentração de sulfito proporcionaram maiores graus de hidrólise. Essa resposta mostra que é possível reduzir a quantidade de sulfito utilizada industrialmente, como no limite inferior de 0,06 M (concentração escolhida para definição da melhor condição de dissolução). O sulfito de sódio (agente redutor) não é dispensável, uma vez que é usado para auxiliar na quebra das ligações dissulfeto e em combinação com as proteases, catalisam a clivagem hidrolítica das proteínas em cadeias polipeptídicas menores.

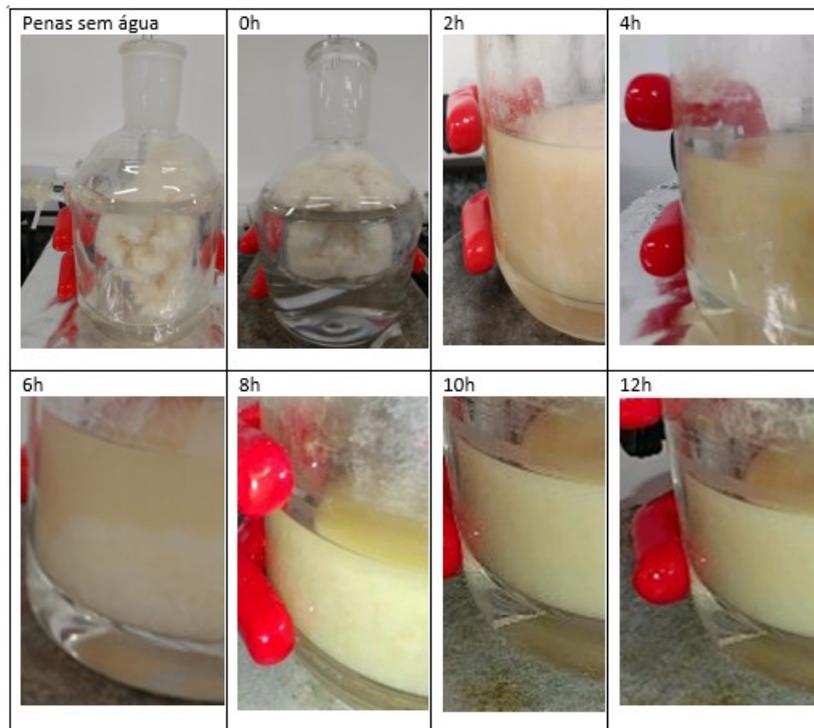
Em relação à temperatura, analisando-se os valores, embora na temperatura mais elevada (90 °C) tenha se obtido o maior resultado de GH, para a escolha das condições foi considerada a qualidade dos peptídeos e aminoácidos. Assim a temperatura de 70 °C foi escolhida para dissolução das penas. Sabe-se que temperaturas altas são comumente aplicadas em processos tradicionais, o que pode levar à má qualidade do ponto de vista nutricional dos peptídeos e aminoácidos obtidos (PAPADOPOULOS et al., 1986; WANG; PARSONS, 1997; ONIFADE et al., 1998; GUPTA et al., 2012). Então buscou-se a escolha de uma temperatura menor que possibilitasse a dissolução das penas (70 °C).

Figura 9 - Superfícies de resposta para o grau de hidrólise em função da temperatura e da concentração de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  durante 2h, 4h, 6h, 8h, 10h e 12h de dissolução.



Através de observação visual, foi possível acompanhar a dissolução das penas ao longo do processo, como mostrado na Figura 10 e no Quadro 5. Esta observação foi aliada às determinações do grau de hidrólise a cada duas horas. Considerou-se que não é necessário prosseguir a etapa de dissolução por mais de 8 horas uma vez que este tempo foi suficiente para dissolver as penas, não sendo observado nenhum fragmento em solução, bem como o grau de hidrólise atingiu valor diferente do valor zero, mas ainda baixo (2,1%) indicando penas dissolvidas e em estágio inicial de hidrólise. Com isto estas estão disponíveis para a ação específica da enzima.

Figura 10 - Evolução da dissolução das penas ao longo do tempo.



Quadro 5 - Evolução da dissolução ao longo do tempo.

Ensaio	Conc.		Conc. Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> (M)	Penas dissolvidas?					
	Subst. (%)	T (°C)		2h	4h	6h	8h	10h	12h
1	2,0	70,0	0,06	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim
2	2,0	70,0	0,10	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim
3	2,0	90,0	0,06	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
4	2,0	90,0	0,10	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
5	<b>4,0</b>	<b>70,0</b>	<b>0,06</b>	<b>Não</b>	<b>Não</b>	<b>Não</b>	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>
6	4,0	70,0	0,10	Não	Não	Não	Sim	Sim	Sim
7	4,0	90,0	0,06	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
8	4,0	90,0	0,10	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
9	1,32	80,0	0,08	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim
10	4,68	80,0	0,08	Não	Não	Não	Sim	Sim	Sim
11	3,0	63,2	0,08	Não	Não	Não	Sim	Sim	Sim
12	3,0	96,8	0,08	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
13	3,0	80,0	0,05	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim
14	3,0	80,0	0,11	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim
15	3,0	80,0	0,08	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim
16	3,0	80,0	0,08	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim
17	3,0	80,0	0,08	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Assim, a melhor condição de dissolução escolhida foi correspondente ao ensaio 5, com 4% de substrato, temperatura de 70 °C e 0,06 M de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>. Bem como, estabeleceu-se o tempo de dissolução em 8 horas, por ser suficiente para a dissolução das penas. Estas condições foram usadas em todos os ensaios de dissolução posteriores.

#### 5.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Após a etapa química de dissolução e estabelecimento como padrão (4% de substrato, 70 °C e 0,06M de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>), por 8 h, foi realizada a execução do planejamento experimental (Tabela 2) para a hidrólise enzimática com a enzima savinase<sup>®</sup>, obtendo-se os resultados apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Grau de hidrólise da queratina de penas de frango durante processo com enzima savinase®.

Ensaio	E/S* (%)	T (°C)	Grau de Hidrólise (%)				
			2h	4h	6h	8h	10h
1	5,0 (-1)	45,0 (-1)	3,2	5,3	5,3	5,3	5,3
2	5,0 (-1)	55,0 (1)	5,3	5,3	6,3	6,3	6,3
3	20,0 (1)	45,0 (-1)	5,3	5,3	5,3	5,3	6,3
4	20,0 (1)	55,0 (1)	5,3	5,3	5,3	6,3	7,4
5	1,9 (-1,41)	50,0 (0)	5,3	5,3	5,3	6,3	6,3
6	23,1 (1,41)	50,0 (0)	6,3	6,3	8,4	8,4	8,4
7	12,5 (0)	43,0 (-1,41)	5,3	6,3	6,3	6,3	6,3
8	12,5 (0)	58,0 (1,41)	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2
9	<b>12,5 (0)</b>	<b>50,0 (0)</b>	<b>7,4</b>	<b>7,4</b>	<b>8,4</b>	<b>8,4</b>	<b>8,4</b>
10	<b>12,5 (0)</b>	<b>50,0 (0)</b>	<b>5,3</b>	<b>7,4</b>	<b>8,4</b>	<b>8,4</b>	<b>8,4</b>
11	<b>12,5 (0)</b>	<b>50,0 (0)</b>	<b>5,3</b>	<b>6,3</b>	<b>7,4</b>	<b>7,4</b>	<b>7,4</b>

Fonte: Elaborada pela autora (2020). \*E/S (concentração enzima /substrato) = 5 % equivale à 0,2 % de savinase em relação ao total de solução.

Observa-se na matriz experimental que, conforme as condições de concentração enzima/substrato (E/S) e de temperatura aplicadas durante a etapa de enzimólise, os graus de hidrólise variaram de 3,2 a 8,4%. Com estes resultados (Tabela 7), montou-se um modelo codificado de 2ª ordem, utilizando o software Statistica 7.0, que relaciona o grau de hidrólise enzimática em função da E/S e da temperatura que pode ser representado pela seguinte equação (6):

$$GH (\%) = 8,1 + 0,6 \cdot E/S - 0,3 \cdot E/S^2 - 0,1 \cdot T - 1,4 \cdot T^2 \quad (6)$$

A análise de variância (Tabela 8) mostrou um coeficiente de determinação  $R^2 = 0,781$ , e o valor de F calculado (3,6) maior que o F tabelado (3,45) e  $p = 0,000003$ . Estes foram considerados aceitáveis e permitiram considerar o modelo adequado para descrever em 78,1 % os dados e construir a superfície de resposta.

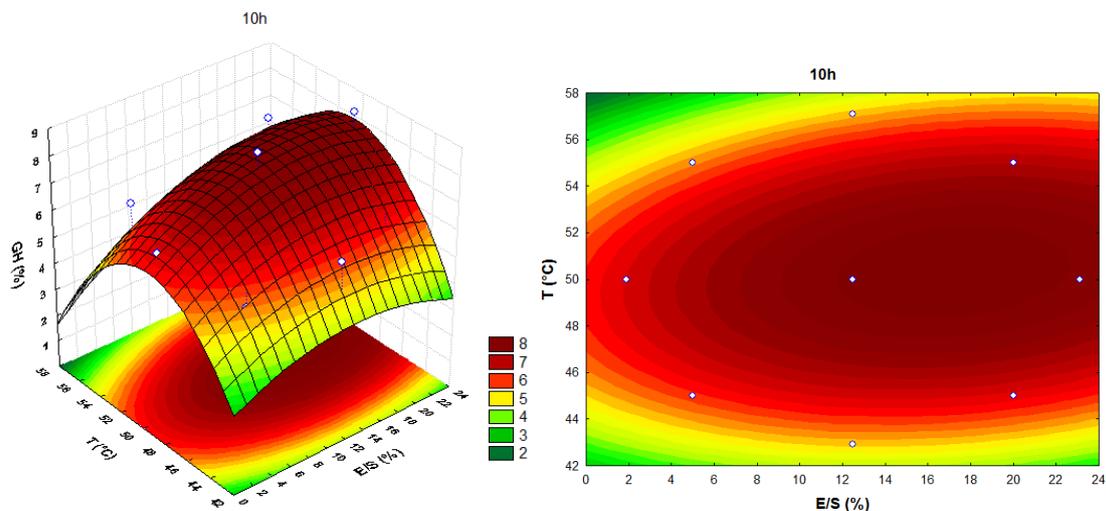
Tabela 8 - Análise de variância (ANOVA) do planejamento experimental para validação do modelo matemático empírico do grau de hidrólise em 10 h de hidrólise enzimática.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados (SQ)	Quadrado médio (QM)	F calculado
Regressão	5	14,4	2,9	3,6
Resíduos	5	4,0	0,8	
Total	10	18,4		

Fonte: Elaborada pela autora (2020).  $R^2 = 78,1 \%$ ;  $F_{5, 5; 0,10} = 3,45$

Com o modelo foi construída a superfície de resposta que é apresentada juntamente com as curvas de contorno na Figura 11.

Figura 11 - Superfície de resposta e curvas de contorno do grau de hidrólise em função da concentração enzima/substrato e da temperatura em 10h de enzimólise.



A variação entre os 11 ensaios é um indicativo de que existe uma faixa ótima para o conjunto de variáveis independentes, concentração enzima/substrato (E/S) e temperatura, onde os maiores graus de hidrólise foram obtidos nos ensaios próximos ao ponto central do DCCR, com a concentração enzima/substrato (E/S) de 12,5 % e a temperatura de 50 °C. Deste modo foi possível estabelecer a melhor condição de hidrólise enzimática da queratina e da ação da savinase<sup>®</sup> para as variáveis estudadas.

A partir das 6 horas, os maiores graus de hidrólise (8,4 %) foram alcançados nos ensaios centrais 9 e 10 e no ensaio 6 (Tabela 7), não variando muito ou se estabilizando ao longo do tempo de hidrólise enzimática com a ação da savinase<sup>®</sup>. A pouca variação pode ser explicada pelo fato de que, no início da proteólise havia maior quantidade de substrato e número de ligações disponíveis para a hidrólise e menor concentração de produtos solúveis competindo com o substrato. Também pode ser explicado pelo fato de que a enzima pode perder sua atividade com o tempo. Assim, a ação da enzima foi mais intensa no início do que nos estágios finais da proteólise, onde observou-se que a reação diminuiu. Isto é um indicativo que, para aplicação industrial, 6 horas seria um tempo suficiente para ação da savinase<sup>®</sup> no substrato de penas.

Os valores de grau de hidrólise próximos a 8 % são satisfatórios, uma vez que o objetivo não é a hidrólise total da queratina, com formação de aminoácidos livres, e sim sua hidrólise parcial para formação de peptídeos. São reportados na literatura graus de hidrólise para diversos hidrolisados: entre 11,5 % - 17,3 % para sub produtos de salmão (pele) (GBOGOURI et al., 2004); 1,88 - 8,26 % para concentrado proteico de leite (ULUKO et al., 2013); 8 - 17 % para proteína de amendoim (NYO, NGUYEN, 2019).

Além disso, os valores de GH encontrados não podem ser considerados unicamente na interpretação da eficácia do processo. Deve-se ser levado em consideração, que modificações químicas e enzimáticas têm sido usadas para melhorar as propriedades nutricionais e funcionais das proteínas, e que a hidrólise enzimática apresenta vantagens sobre a modificação química porque se processa em condições brandas e inclui a especificidade da ação da enzima em relação ao substrato, havendo pouca probabilidade de ocorrer reações indesejáveis, que resultem na formação de produtos de baixa qualidade. Isso mostra a importância de avaliar a qualidade do hidrolisado através da realização de todas as análises propostas.

## 5.5 TRATAMENTO COM ULTRASSOM

A partir dos resultados da etapa química de dissolução, os ensaios com aplicação de ultrassom foram realizados com o líquido solubilizado no tempo de 8 horas, à temperatura de 70 °C, concentração de 4% de substrato e 0,06 M de sulfito.

Os ensaios com ultrassom como pré-tratamento da etapa enzimática foram realizados de acordo com o planejamento experimental e os resultados para o grau de hidrólise ao longo do tempo do processo enzimático com Savinase<sup>®</sup> são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Grau de hidrólise durante etapa enzimática para amostras com pré-tratamento com ultrassom.

Ensaio	Potência (W)	Tempo (min)	Grau de Hidrólise (%)			
			2h	4h	6h	8h
1	200,0 (-1)	5,0 (-1)	4,8	6,0	6,0	6,0
2	200,0 (-1)	20,0 (1)	7,2	7,2	7,2	7,2
3	400,0 (1)	5,0 (-1)	6,0	7,2	6,0	7,2
4	400,0 (1)	20,0 (1)	9,6	9,6	10,8	10,8
5	160,0 (-1,41)	12,5 (0)	7,2	7,2	7,2	7,2
<b>6</b>	<b>442,0 (1,41)</b>	<b>12,5 (0)</b>	<b>9,6</b>	<b>9,6</b>	<b>10,8</b>	<b>10,8</b>
7	300,0 (0)	1,9 (-1,41)	4,8	4,8	4,8	4,8
8	300,0 (0)	23,1 (1,41)	9,6	10,8	9,6	9,6
9	300,0 (0)	12,5 (0)	6,0	6,0	7,2	7,2
10	300,0 (0)	12,5 (0)	6,0	7,2	8,4	8,4
11	300,0 (0)	12,5 (0)	7,2	7,2	7,2	7,2

Fonte: Elaborada pela autora (2020).

O valor máximo encontrado para o grau de hidrólise nos ensaios com ultrassom foi 10,8 %. Já para as amostras controle, sem tratamento por ultrassom, o valor máximo foi de 8,4 %.

O maior grau de hidrólise (9,6 %) nas duas primeiras horas de experimento, foi superior ao obtido no tempo de seis horas (8,4 %) da hidrólise sem pré-tratamento de ultrassom. Isto sugere uma redução de 4h (equivalente a 66,67 %) no tempo de hidrólise enzimática, o que é relevante em termos de aplicação industrial, sendo um indicativo da eficiência da aplicação do ultrassom.

Os resultados obtidos usando o ultrassom foram analisados pela ANOVA, cujo resultado está apresentado na Tabela 10. O p-valor da regressão foi menor que 0,0001 e o F calculado (17,5) maior que o F tabelado (3,11), a 90% de significância. O modelo empírico codificado para o grau de hidrólise na enzimólise com pré-tratamento com US, dentro de 8 horas da hidrólise enzimática, pode ser representado pela Equação 7. O coeficiente de determinação encontrado na regressão ANOVA foi de 0,815, indicando que os dados observados são preditivos e explicados por 81,5 %.

$$\text{GH} (\%) = 7,8 + 1,2 x_1 + 1,4 x_2 \quad (7)$$

Onde:  $x_1$  - potência;

$x_2$  - tempo

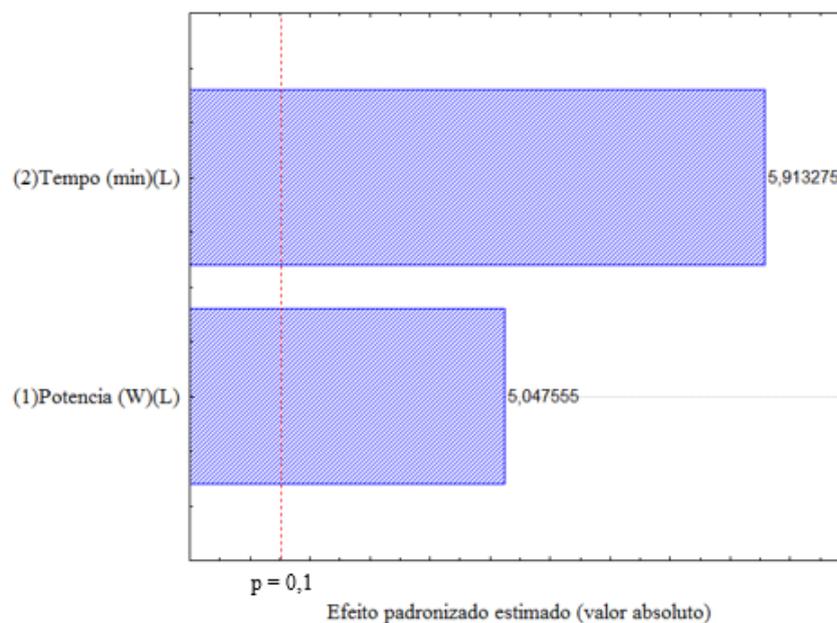
Tabela 10 - Análise de variância (ANOVA) do planejamento experimental para validação do modelo matemático empírico do grau de hidrólise enzimática, após tratamento com ultrassom.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados (SQ)	Quadrados médios (QM)	F calculado
Regressão	2	29,0	14,5	17,5
Resíduos	8	6,6	0,83	
Total	10	35,6		

Fonte: Elaborada pelo autor (2020).  $R^2 = 81,5 \%$ ;  $F_{2,8; 0,10} = 3,11$

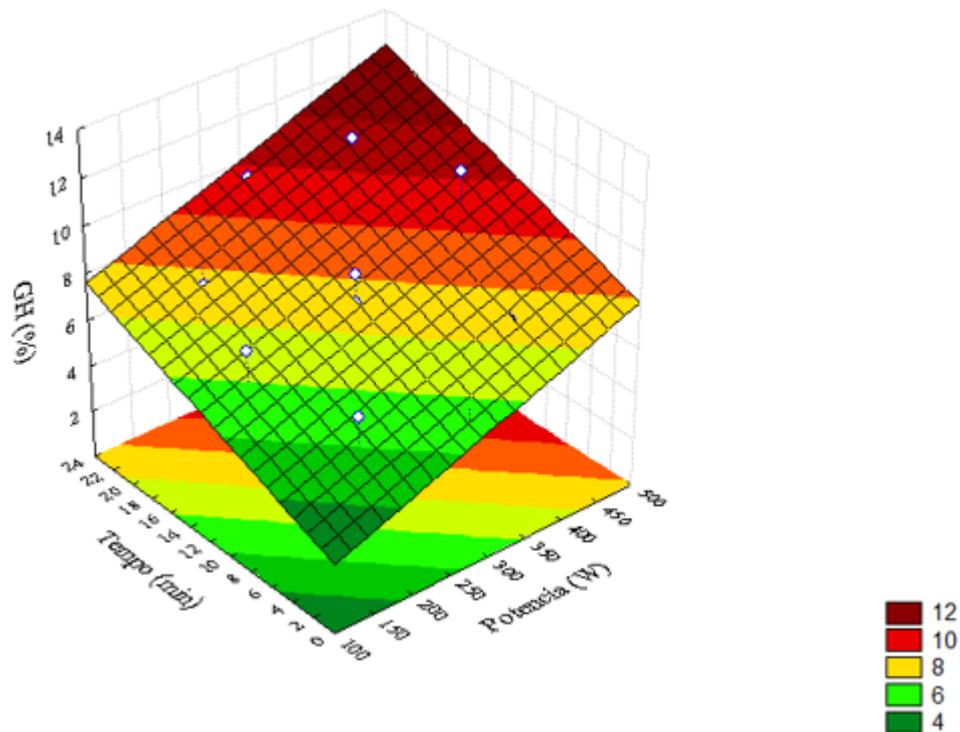
É possível visualizar na Figura 12 o efeito positivo significativo ( $\alpha = 0,10$ ) do tempo e da potência para a variável resposta grau de hidrólise.

Figura 12 - Efeitos das variáveis no grau de hidrólise (GH) da queratina de penas de frango em 8h de processo.



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Figura 13 - Superfície de resposta do grau de hidrólise (GH) em função da potência e do tempo de aplicação do ultrassom.



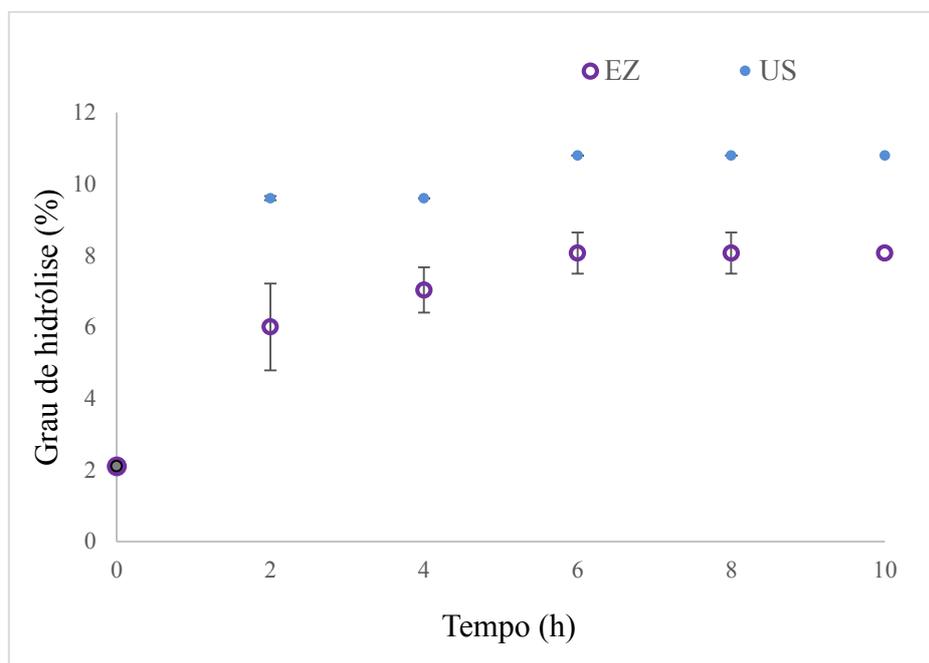
Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Observa-se (Tabela 9) que foram encontrados bons resultados nos ensaios 4, 6 e 8. Os ensaios 4 e 6 correspondem à maiores potências 400 e 442 W respectivamente, no ensaio 8 foi aplicada a potência intermediária (300 W), porém por maior tempo (23,1 min). A sugestão é usar potências maiores (entre 400 e 450 W), próximas à potência limite do equipamento (500 W), por tempos maiores (entre 12,5 e 20 min ou mais) uma vez que estas condições resultaram em maiores graus de hidrólise. Por questões operacionais, não foram feitos ensaios para tempos maiores à 450 W, devido ao aquecimento excessivo do equipamento, o que poderia causar aquecimento na solução e, conseqüentemente, alterar a qualidade do produto. Tempos mais longos e potencias maiores podem ser testados por outros pesquisadores ou empresas que utilizam outros equipamentos.

O uso do ultrassom mostrou-se eficiente como pré-tratamento da hidrólise enzimática, pois proporcionou uma melhor atividade da enzima, com aumento do grau de hidrólise para todos os tempos de enzimólise (Figura 14). Assim, a energia ultrassônica utilizada (442 W) foi suficiente para alterar as características da solução e acelerar a difusão e ação da savinase (endoprotease que atua dentro da cadeia) no meio, facilitando a clivagem e aumento do grau de hidrólise. Segundo Chemat (2011), as bolhas de cavitação geradas pelo efeito ultrassônico

colapsam e liberam grandes quantidades de energia. Isso cria pontos de acesso capazes de acelerar drasticamente a reatividade química no meio. O efeito da cavitação pode ter induzido alterações na estrutura da queratina, como redução no tamanho das partículas, expondo mais locais à ação enzimática. Além disso, o ultrassom pode ser considerado uma tecnologia não térmica, além de ser uma tecnologia limpa.

Figura 14 - Ensaio enzimáticos sem pré-tratamento (EZ- média de pontos centrais: E/S = 12,5%; T = 50 °C) e com pré-tratamento por ultrassom (US - 442 W; 12,5 m).



Fonte: Elaborada pela autora (2020). \* ). \* Nos pontos de dados onde não se visualizam barras de erro o desvio padrão foi menor do que 5%.

Baseando-se nas respostas obtidas, o ensaio 6 (442 W; 12,5 min) foi considerado o melhor. Nos experimentos seguintes a potência usada foi de 450 W por 12,5 min para o pré-tratamento do hidrolisado para caracterização quanto suas propriedades.

## 5.6 TRATAMENTO COM MICRO-ONDAS

O tratamento com micro-ondas foi realizado seguindo o planejamento experimental  $2^2$  e os resultados para o grau de hidrólise ao longo do tempo da enzimólise com savinase® estão apresentados na Tabela 11. Os ensaios de aplicação de micro-ondas foram realizados nas penas solubilizadas por 8 h à 70 °C, concentração de substrato 4 % e 0,06 M de sulfito.

Tabela 11 - Grau de hidrólise da queratina de penas de frango pré-tratadas em micro-ondas durante a enzimólise.

Ensaio	Potência (W)	Tempo (min)	Grau de Hidrólise (%)			
			2h	4h	6h	8h
1	200,0 (-1)	5,0 (-1)	6,0	6,0	6,0	6,0
2	200,0 (-1)	20,0 (1)	6,0	6,0	6,0	6,0
3	400,0 (1)	5,0 (-1)	6,0	7,2	7,2	7,2
4	400,0 (1)	20,0 (1)	6,0	7,2	7,2	7,2
5	160,0 (-1,41)	12,5 (0)	4,8	6,0	6,0	6,0
<b>6</b>	<b>442,0 (1,41)</b>	<b>12,5 (0)</b>	<b>7,2</b>	<b>7,2</b>	<b>8,4</b>	<b>8,4</b>
7	300,0 (0)	1,9 (-1,41)	6,0	6,0	6,0	6,0
8	300,0 (0)	23,1 (1,41)	6,0	6,0	6,0	6,0
9	300,0 (0)	12,5 (0)	6,0	6,0	6,0	6,0
10	300,0 (0)	12,5 (0)	6,0	6,0	7,2	7,2
11	300,0 (0)	12,5 (0)	6,0	6,0	6,0	6,0

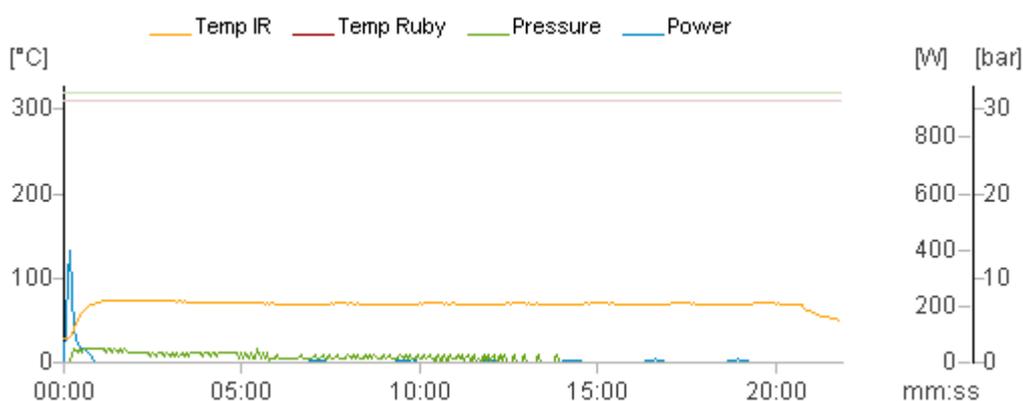
Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Analisando a Tabela 11, a melhor resposta para os graus de hidrólise foi no ensaio 6, onde foi aplicada a maior potência (442 W) por 12,5 min. Este ensaio foi escolhido como o padrão para as demais etapas do estudo. E foi comparado com o melhor ensaio da enzimólise convencional (ensaios 9, 10 e 11; pontos centrais), não havendo diferença estatística (ANOVA;  $\alpha = 0,05$ ). Logo, nas condições aplicadas, o micro-ondas não teve influência significativa na enzimólise ao considerar-se a variável resposta GH. Uma vez que seus valores não foram diferentes do tratamento padrão com a enzima, restou avaliar os produtos da enzimólise sem e com tratamento quanto à outras propriedades, que estão discutidas no decorrer do trabalho.

Uma explicação para isto seria que o tempo de permanência na potência programada foi muito curto pois a temperatura se elevou rapidamente no reator. Como o tubo vial do micro-ondas tem uma capacidade de 30 mL, considerando o espaço livre foram medidos 20 mL de amostra e como na programação do equipamento estabeleceu-se uma temperatura máxima de 70 °C, a potência aplicada foi suficientemente grande para elevar a temperatura rapidamente, então o equipamento automaticamente reduzia a potência aplicada para manter a temperatura.

O controle da temperatura e potência no reator de micro-ondas pode ser observado em um dos gráficos gerados durante o pré-tratamento (Figura 15). Isto ocorreu em todas as potências do planejamento experimental aplicadas, mesmo reduzindo a potência programada. Como a temperatura usada foi estabelecida em no máximo 70 °C, considerando a qualidade esperada para os hidrolisados a serem obtidos, não fazia sentido aumentar a temperatura limite no equipamento de micro-ondas. Esta possibilidade não é descartada para uma outra pesquisa onde este controle não for considerado como fator importante para os resultados almejados. Esperou-se então avaliar se a potência exercida sobre a amostra causou diferenças qualitativas em relação aos demais tratamentos no decorrer das análises de caracterização.

Figura 15 - Comportamento das variáveis temperatura (°C) x potência (W) x tempo (min) durante o pré-tratamento em reator de micro-ondas.



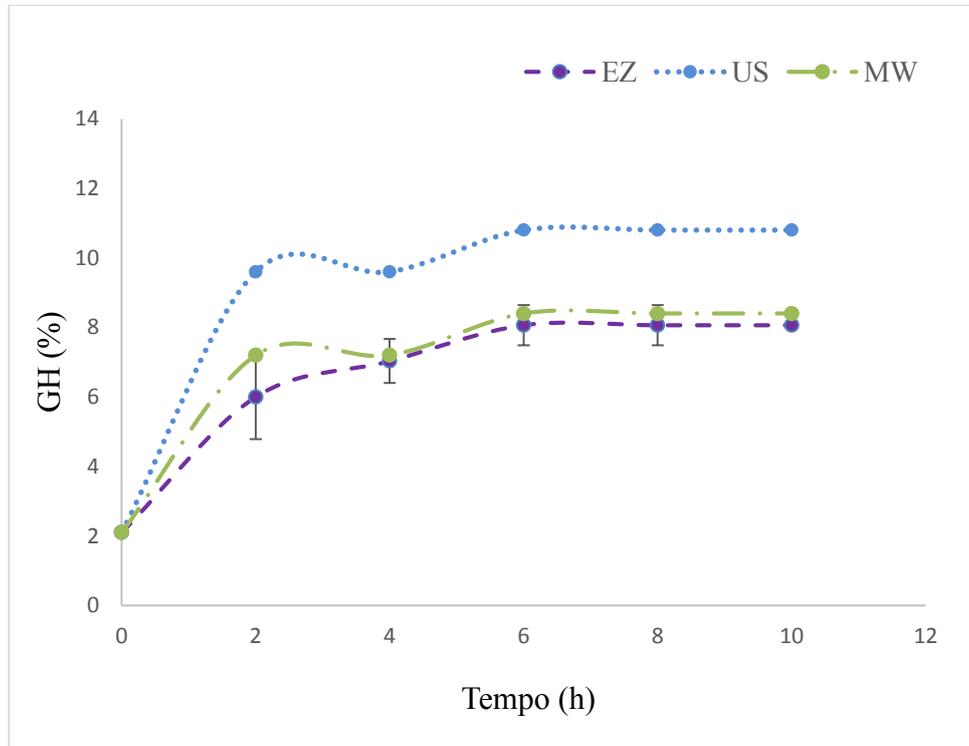
Fonte: Arquivo pessoal (2020). \* Ensaio 4 (400 W; 20 min)

Nenhuma das variáveis independentes (potência; tempo) foram significativas ao nível de significância de 5% para a variável resposta grau de hidrólise em todos os tempos analisados.

Na Figura 16 é mostrado um comparativo do grau de hidrólise durante a enzimólise da queratina de penas de frango sem pré-tratamento (EZ), com pré-tratamento de ultrassom (US) e micro-ondas (MW). O ultrassom (US) apresentou um desempenho superior ao micro-ondas

(MW) e à enzimólise sem pré-tratamento (EZ). Os resultados estão de acordo com os obtidos para o grau de hidrólise discutidos até o momento.

Figura 16 - Grau de hidrólise (GH) ao longo da enzimólise dos três tratamentos EZ, US, MW.



Fonte: Elaborada pela autora (2020). \* Nos pontos de dados onde não se visualizam barras de erro o desvio padrão foi menor do que 5%.

Foi feita análise de variância e teste de Tukey para comparar os três tratamentos, para cada tempo e o tratamento MW, em termos de eficiência relacionada ao grau de hidrólise não foi considerável, pois não diferiu estatisticamente ( $\alpha = 0,05$ ) do EZ, enquanto que o US diferiu do EZ e do MW. Assim, a hidrólise enzimática com solubilizado pré-tratado com ultrassom mostrou-se mais eficiente em relação aos demais tratamentos. Em termos qualitativos, os tratamentos foram avaliados e discutidos nos resultados das análises de caracterização dos hidrolisados resultantes destes.

## 5.7 ANÁLISES DO HIDROLISADO DE QUERATINA DE PENAS DE FRANGO

Para a avaliação quantitativa e qualitativa dos hidrolisados o mesmo foi filtrado com fluxo total de  $2,93 \text{ L} \cdot \text{h} \cdot \text{m}^{-2}$  em membranas de  $0,2 \mu\text{m}$ . Na figura 17 observa-se o hidrolisado antes e depois da filtração.

Figura 17 - Hidrolisado de queratina de penas de frango antes e após microfiltração.



### 5.7.1 Quantificação de proteína e composição centesimal

O teor de proteína total obtido nos hidrolisados filtrados está apresentado na Tabela 12.

A partir da concentração inicial de penas (4 %) e da proteína total das penas ( $85,31 \pm 0,43 \%$ ), a quantidade calculada de proteínas no hidrolisado final seria aproximadamente  $3,41 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ . O valor médio determinado em análise ( $3,75 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ ) é compatível com este cálculo, sendo apenas 9,91 % maior. Esta diferença, bem como a diferença estatística ( $\alpha = 0,05$ ) entre os três hidrolisados, é justificável, não só pelos desvios padrão das análises mas também por uma natural evaporação da água durante todas as etapas do processo, que incluíram aquecimento à  $70 \text{ }^\circ\text{C}$ , agitação por horas, ocorrendo possíveis trocas de vapor com o ar ambiente.

Tabela 12 - Teor de proteína total dos hidrolisados finais: EZ (enzimático), US (ultrassom) e MW (micro-ondas).

Amostra	Concentração média de proteína (g·100 mL <sup>-1</sup> )	Média geral (g·100 mL <sup>-1</sup> )
EZ	3,81 <sup>a</sup> ± 0,02	
US	3,75 <sup>b</sup> ± 0,03	3,75 ± 0,06
MW	3,69 <sup>c</sup> ± 0,01	

Fonte: Elaborada pela autora (2020). n = 3 repetições por tratamento; médias seguidas de letras minúsculas diferentes sobrescritas indicam haver diferença significativa entre os tratamentos em nível de 5%, por teste de Tukey.

Considerando que o hidrolisado é um produto líquido, cuja umidade final determinada foi 95,05 %, o teor de proteína em base seca é de 75,78% (Tabela 13), ele pode ser caracterizado como um material rico em proteína solúvel.

Tabela 13 - Composição centesimal média do hidrolisado de queratina.

Macronutriente	Valor médio (%)	Nutriente em base seca (%)
Proteínas	3,75 ± 0,06	75,78
Umidade	95,05 ± 0,27	-
Cinzas	0,99 ± 0,02	18,95
Lipídeos	0,21 ± 0,00	5,27

Fonte: Elaborada pela autora (2020). Os lipídeos foram calculados por diferença.

Wang, Parsons (1997), Tiwary, Gupta (2012) e Eaksuree et al. (2016), afirmam em seus estudos que o processamento comercial usual das penas para produção da farinha pode afetar a qualidade da proteína. Assim, as pesquisas correntes visam a extração de queratina de penas utilizando processos mais brandos, que afetem menos a qualidade da proteína e, ao mesmo tempo, tenham boa eficiência de extração e hidrólise. Exemplo disto é o trabalho desenvolvido por Kshetri et al. (2019), no qual foi utilizada uma bactéria queratinolítica *Chryseobacterium sediminis* RCM-SSR-7 isolada de solo para a produção de hidrolisado de penas, com condição ideal a 5 % de penas em solução por 84 horas de incubação, obtendo um teor de peptídeos solúveis de 295 mg · g<sup>-1</sup> de pena. Já no presente trabalho foi atingido 3,75 g de proteína solúvel por 100 mL de hidrolisado, onde os 3,75 g de proteína foram extraídos dos 4% (4 g) de penas

usadas no início do processo, equivalendo a 937,5 mg de proteína/g de pena utilizada. Logo, além de ter alcançado maior teor de proteínas solúveis, o presente processo foi executado em tempo muito menor que o do citado estudo (16 h).

O teor de cinzas reflete os minerais presentes naturalmente na pena, o sulfito de sódio adicionado na etapa química e os sais formados da reação de neutralização do meio alcalino (NaOH) com HCl, consequência do ajuste do pH da etapa enzimática e parte no final do processo, onde o hidrolisado teve o seu pH ajustado em 7,5. Os lipídeos são os provenientes naturalmente das penas.

### 5.7.2 Perfil peptídico

Neste tópico estão organizados os resultados da análise por cromatografia líquida de alta eficiência/espectrometria de massa (HILIC - ESI - QTOF - MS) para os hidrolisados de queratina de penas obtidos após hidrólise enzimática (EZ, US, MW). Foi possível a análise dos hidrolisados com espectrômetro de massa de alta performance, ressaltando-se que, comparadas à proteínas de alta massa molecular, a sensibilidade desse método é consideravelmente melhor para peptídeos, principalmente nas estruturas peptídicas compostas por até 20 aminoácidos (HAN, ASLANIAN, YATES, 2008).

Os espectros de massa obtidos estão dispostos nas Figuras 18, 19, 20 e na Tabela 14 estão detalhados os compostos detectados com seu respectivo tempo de retenção, massa -  $m/z$  e intensidade ou abundância.

Na análise dos espectros de massa gerados (Figuras 18, 19 e 20), os picos com boa resolução foram selecionados, sendo 8 principais para o hidrolisado EZ, 6 para o US e 7 para o MW. A análise revelou elementos com massa molecular de 245 a 1370 Daltons (Da) que representam peptídeos di-, tri- ou polipeptídeos de baixa massa molecular (menos de 1000 Da).

Figura 18 - Espectro de massa (HILIC - ESI - QTOF - MS) do hidrolisado enzimático de queratina de penas de frango.

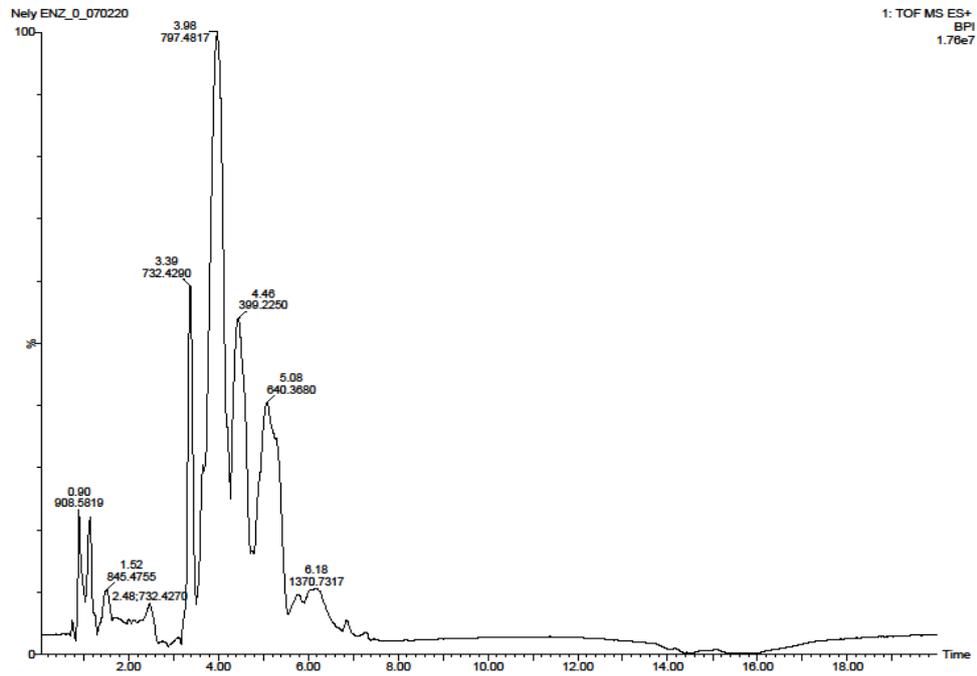


Figura 19 - Espectro de massa (HILIC - ESI - QTOF - MS) do hidrolisado enzimático de queratina submetido à pré-tratamento com ultrassom.

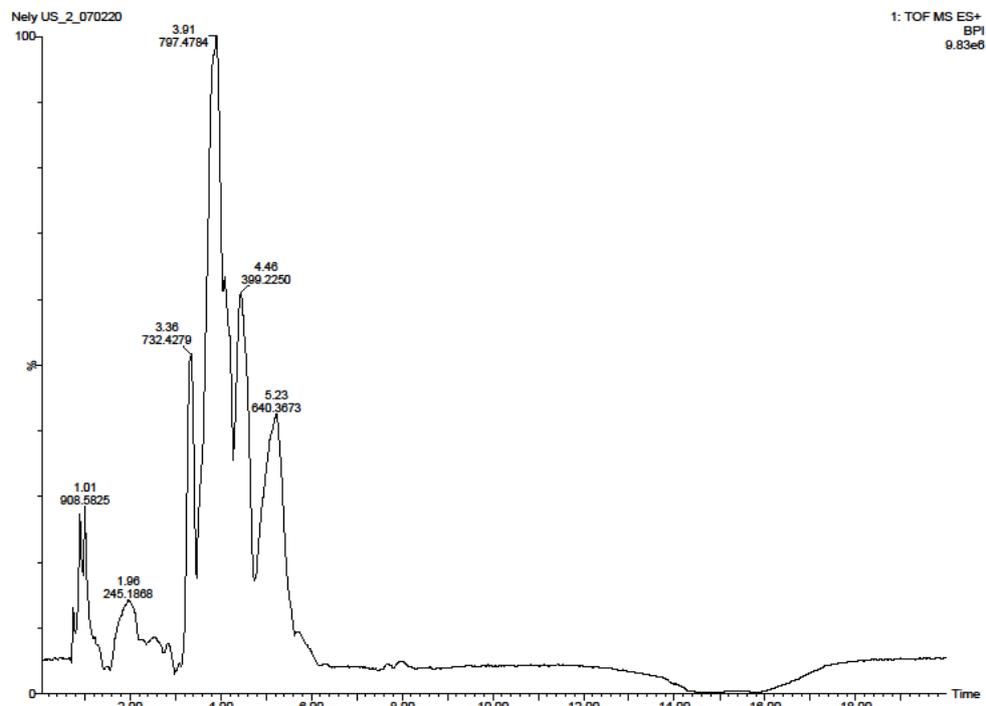
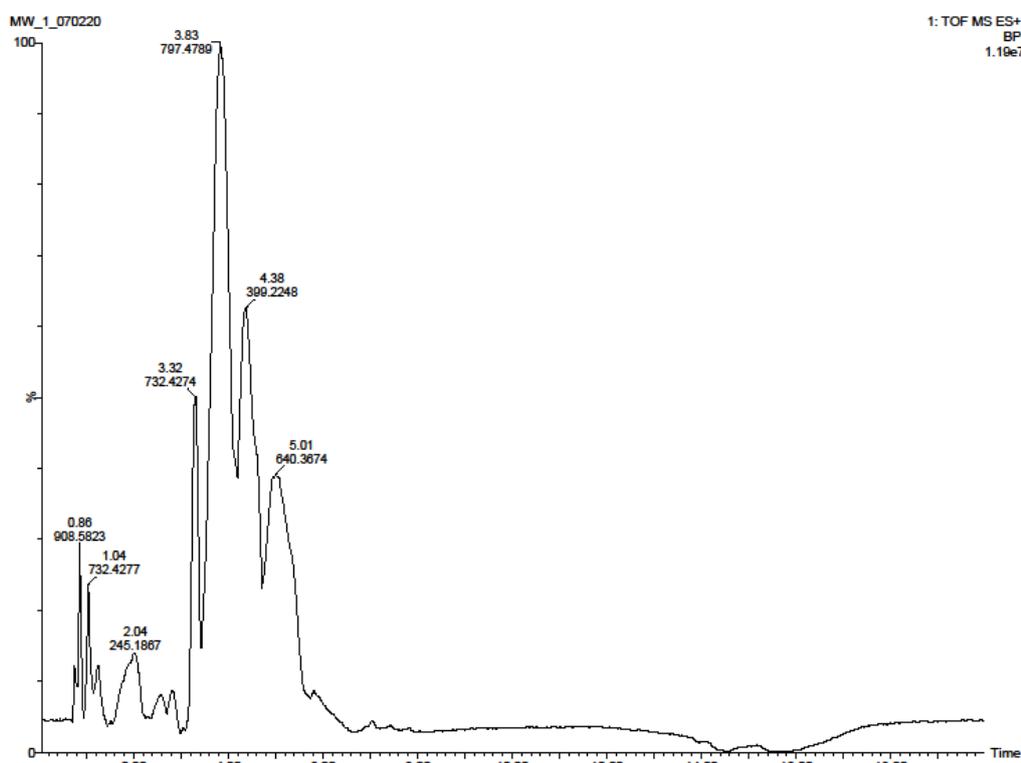


Figura 20 - Espectro de massa (HILIC - ESI - QTOF - MS) do hidrolisado enzimático de queratina submetido à pré-tratamento com micro-ondas.



Observa-se que o perfil peptídico dos três hidrolisados tem semelhanças, no entanto o espectro US apresentou um número menor de picos, com intensidade um pouco maior e boa eficiência. Em todos as massas correspondentes à peptídeos da ordem de 600 a 800 Da foi abundante. Um tripeptídeo de massa 399 Da também teve intensidade expressiva (54 % no EZ, 61 % no US e 63 % no MW). As massas detectadas indicam que os peptídeos formados pela hidrólise da queratina têm entre 2 e 5 resíduos de aminoácidos. Sendo detectada a menor massa de 245 Da para os hidrolisados US e MW, correspondente à um dipeptídeo. Já para o hidrolisado EZ foi detectada uma massa maior de 1370 Da, com intensidade de apenas 11 %. Mesmo assim, é bem abaixo da proteína íntegra, queratina, cuja massa é da ordem de 10.000 a 12.000 Da (FRASER, PARRY, 2008; WANG et al., 2016). Logo as amostras foram bem hidrolisadas, com fracionamento e formação de di-, tri e oligopeptídeos, corroborando com os resultados obtidos para o grau de hidrólise.

Tabela 14 - Resumo dos peptídeos identificados nos hidrolisados de queratina pela análise HILIC - ESI - QTOF - MS.

Hidrolisado	m/z	Intensidade (%)	Tempo (min)	Tipo de peptídeo proposto
EZ	399,2250	54	4,46	tripeptídeo
	640,3880	40	5,08	oligopeptídeo
	732,4290	59	3,39	oligopeptídeo
	732,4270	<10	2,48	oligopeptídeo
	797,4817	100	3,98	oligopeptídeo
	845,4755	10	1,52	oligopeptídeo
	908,5819	23	0,90	oligopeptídeo
	1370,7317	11	6,18	oligopeptídeo
US	245,1868	15	1,96	dipeptídeo
	399,2250	61	4,46	tripeptídeo
	640,3673	43	5,23	oligopeptídeo
	732,4279	52	3,36	oligopeptídeo
	797,4784	100	3,91	oligopeptídeo
	908,5825	28	1,01	oligopeptídeo
	MW	245,1867	13	2,04
399,2248		63	4,38	tripeptídeo
640,3674		40	5,01	oligopeptídeo
732,4274		50	3,32	oligopeptídeo
732,4277		25	1,04	oligopeptídeo
797,4789		100	3,83	oligopeptídeo
908,5823		29	0,86	oligopeptídeo

Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

A qualidades nutricionais e bioativas de hidrolisados proteicos estão diretamente relacionadas ao seu perfil peptídico. Relaciona-se boa qualidade aos hidrolisados que apresentam elevados teores de di- e tri- peptídeos e baixa porcentagem de peptídeos com massa molecular maior que 800 Da. Curiosamente, dentro da sequência da proteína original, os peptídeos são inativos e, portanto, devem ser liberados para exercer um melhor efeito (RYAN et al., 2011).

Quando liberados da sequência proteica, principalmente por hidrólise química, ação proteolítica de microrganismos ou hidrólise enzimática, os peptídeos podem se tornar ativos. Sendo amplamente utilizados para aplicações industriais de alimentos e farmacêuticas (LEMES

et al., 2016). Assim, os peptídeos obtidos neste trabalho são componentes com potencial para aplicações farmacêuticas, cosméticas e alimentares.

### 5.7.3 Digestibilidade *in vitro*

Quando se avalia a qualidade nutricional de um produto, não só a quantidade de nutrientes, a exemplo da proteína é importante, mas também a sua digestibilidade. Analisando os resultados da Tabela 15, estes indicam que o produto obtido tem alta digestibilidade, principalmente se comparado às penas íntegras que possuem baixa digestibilidade (9,6 % - 15,6 %) dada a hidrofobicidade em água da queratina e a sua estabilidade estrutural, especialmente da  $\beta$ -queratina, que é resistente à degradação devido as ligações dissulfeto e de hidrogênio (ADLER et al, 2018; TIWARY, GUPTA, 2012).

Tabela 15 - Digestibilidade proteica *in vitro* dos hidrolisados de queratina de penas de frango.

Amostra	Digestibilidade (%)	Digestibilidade Média (%)
EZ	80,23 <sup>a</sup> ± 0,20	
US	100,00 <sup>b</sup> ± 0,09	89,28 ± 9,99
MW	87,60 <sup>c</sup> ± 0,10	

Fonte: Elaborada pela autora (2020). n= 3 repetições por tratamento; médias seguidas de letras minúsculas diferentes sobrescritas indicam haver diferença significativa entre os tratamentos em nível de 5% por teste de Tukey.

A clivagem das ligações peptídicas aumenta os níveis de grupos amino e carboxila livres, resultando em maior solubilidade (SARMADI, ISMAIL, 2010). Valores altos de digestibilidade eram esperados, visto que as penas foram solubilizadas e hidrolisadas, com produção de peptídeos de menor cadeia, mais solúveis e, conseqüentemente, absorvíveis pelo trato gastrointestinal. Foi possível observar através dos espectros de massa, que os tamanhos dos peptídeos foi de no máximo 1.370 Da, lembrando que a queratina tem tamanho da ordem de 10.000 a 12.000 Da (FRASER, PARRY, 2008; WANG et al., 2016).

Houve diferença significativa ( $\alpha = 0,05$ ) entre os três tratamentos. As amostras do processo no qual foram submetidas ao tratamento de ultrassom (US) apresentaram digestibilidade superior as demais. A explicação disto pode estar associada ao efeito do ultrassom, pois a turbulência, cavitação e energia liberada podem causar alterações nas cadeias polipeptídicas como incorporação de água e ar. E, dado que a queratina é hidrofóbica e tem

estrutura recalcitrante, a ação da endoenzima (savinase) é facilitada, promovendo a quebra de estrutura e maior grau de hidrólise (JOVANOVIĆ et al., 2016; HOLKAR et al., 2016, 2018).

Dentro da cadeia de produção animal, um aspecto importante a ser considerado, é a qualidade das matérias-primas para a fabricação de rações. Farinhas de penas comumente utilizadas como ração animal podem ter sua qualidade melhorada. Se forem comparadas quanto sua digestibilidade, os valores encontrados para farinha de penas comercial 54,9 - 57,8 % (ADLER et al, 2018; KSHETRI et al., 2019), a produzida por hidrólise com queratinase de *Bacillus licheniformis* ER-15 (73,4 %) (TIWARY, GUPTA, 2012), o hidrolisado de proteína de penas (86 %) produzido por Kshetri et al. (2019), o hidrolisado produzido no presente estudo apresenta melhor digestibilidade (89,28 %). Este valor é 30 % maior do que uma farinha comercial de penas. Sendo assim, pode ser usado como uma alternativa de insumo a ser adicionado na ração ou até mesmo em bebedouros para diversos animais, tais como aves, suínos, gados, peixes ou animais de estimação. A viabilidade técnica e econômica do uso do hidrolisado obtido no presente estudo pode ser estudada, uma vez que este tem alto valor agregado. É necessário avaliar aplicações mais finas como aplicação em alimentos e cosméticos.

Direcionado ao consumo humano, seria interessante avaliar sua aplicabilidade como ingrediente de alimentos ou suplementos alimentares. Proteínas com alta digestibilidade são ideais para situações de estresse em que o corpo precisa de rápida reposição proteica. Sabe-se que os suplementos a base de proteínas são largamente utilizados por atletas e praticantes de exercícios, a exemplo da proteína do soro do leite (whey protein), devido ao seu alto valor nutricional e sua digestibilidade, fator relevante para estimar a absorção intestinal destas proteínas. Almeida et al. (2015) determinaram a digestibilidade proteica in vitro de proteína de soro de leite de fabricantes brasileiros (88,4 %), dos Estados Unidos (91,7 %) e os compararam com a digestibilidade da caseína (83,7 %) e da soja (55,2 %). Assim, o hidrolisado de queratina tem melhor digestibilidade (89,28 %) do que os produtos citados. Entretanto, mesmo não sendo mais caracterizado como resíduo, é necessário verificar a legislação internacional e/ou de cada país para sua aplicação em alimentos.

Um fato interessante é que a L-cisteína, aminoácido não essencial componente da queratina, é extraída de penas, lã, cabelo humano ou pelo suíno sendo utilizada como aditivo alimentar em aplicações de panificação, utilizado como agente redutor em massas de pizzas, pães e croissants para dar elasticidade à massa e reduzir o tempo de mistura. As legislações de aditivos alimentares variam de acordo com o país, na Turquia seu uso é proibido, já no banco de dados de aditivos alimentares da Comissão Europeia, o uso da l-cisteína é permitido

possuindo os códigos E910, E920 e E921 (AHMED, 2003; YACOUBOU, 2011; ISMAIL et al., 2014; DOGAN et al., 2018).

Do ponto de vista de segurança dos alimentos, a qualidade microbiológica não deixaria a desejar, uma vez que a microfiltração com membrana de diâmetro de poro 0,20  $\mu\text{m}$  foi uma etapa do processo utilizada no presente estudo. Através da microfiltração, bactérias, fungos e vírus são retidos na membrana (HABERT, 2006). O hidrolisado também não oferece perigo químico uma vez que a base (NaOH) usada no processo foi neutralizada com HCl, formando sal (NaCl) e o sulfito ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) foi usado em baixas concentrações (0,06 M), além de ser um conservante comumente usado em alimentos, provado como seguro, GRAS (generally recognized as safe) pela Food and Drug Agency (FDA, 2019).

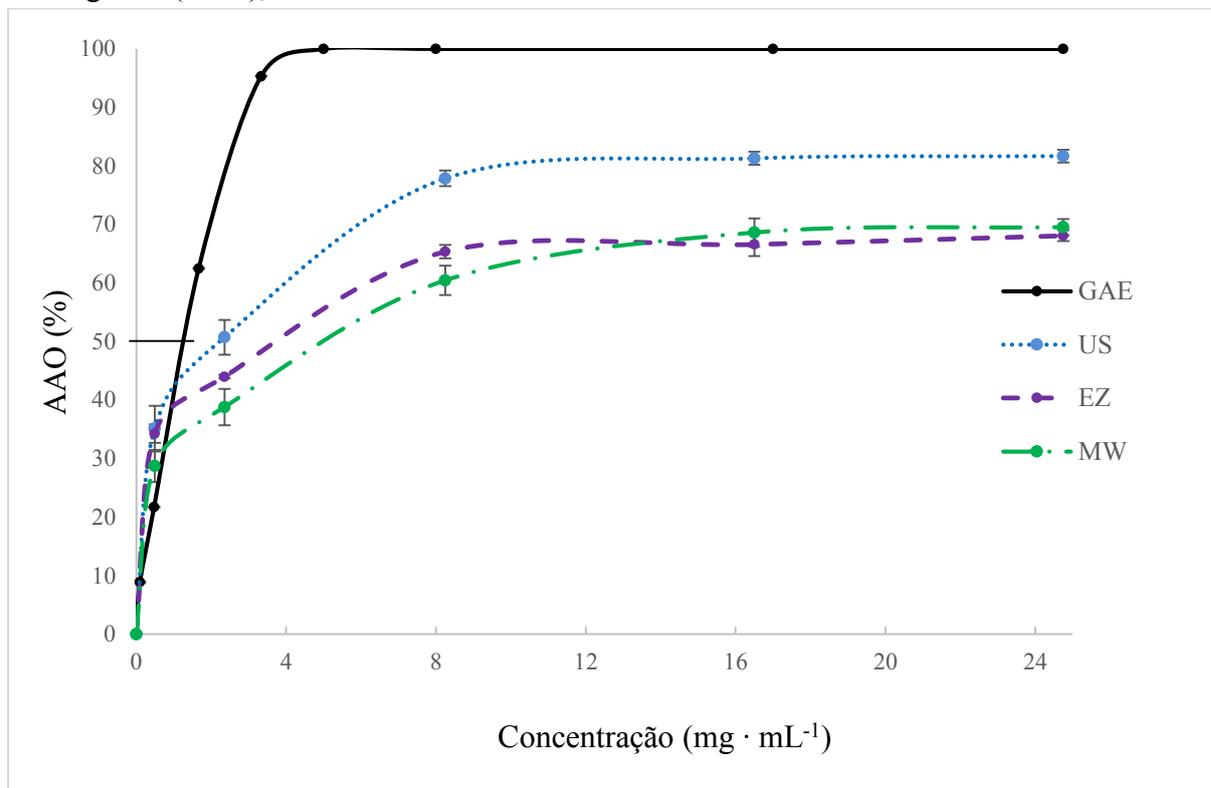
Quanto as suas características sensoriais, um estudo deve ser realizado uma vez que o sabor amargo pode ser oriundo, em parte, da massa molecular dos peptídeos (MOHR, 1980). Com a hidrólise total ou parcial de proteínas por vezes há a formação de gosto amargo. No entanto é relatado que o amargor de peptídeos com massa molecular abaixo de 1000 Da é muito menor do que em frações com uma massa molecular mais alta (CHO, 2004). Por outro lado, este amargor pode resultar do tipo de enzima utilizado e da proteína hidrolisada. Essa característica dos hidrolisados é causada principalmente por oligopeptídeos hidrofóbicos (GILDBERG, et al., 2002). Quando Ozecan e Kurdal (2012), adicionaram proteases neutras de *B. subtilis* em queijo, resultou em amargor devido à intensa quebra de caseína, o amargor não foi observado na mesma intensidade em queijos adicionados de lipase de *Mucor miehei*.

#### 5.7.4 Atividade antioxidante

A análise sobre o radical livre DPPH<sup>+</sup> baseia-se na redução do mesmo por agentes redutores (antioxidantes), que leva a uma diminuição de sua absorbância a 515 - 517 nm.

Uma substancia padrão utilizada por ter reconhecida atividade antioxidante é o ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico). Ele é um composto fenólico encontrado naturalmente em folhas de chá e em frutas, importante não só para a saúde, mas para a prevenção de ranço em óleos e gorduras comestíveis (BADHANI, SHARMA, KAKKAR, 2015; SARKER, OBA, 2019). Assim, foi determinada a atividade antioxidante de uma solução estoque de ácido gálico a 0,01  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , concomitante com diluições das amostras, e os resultados estão apresentados na Figura 21.

Figura 21 - Porcentagem de atividade antioxidante (% AAO) e  $IC_{50}$  das amostras e do padrão ácido gálico (GAE), frente ao radical DPPH<sup>+</sup>.



Fonte: Elaborada pela autora (2020). \* Concentrações expressas em base seca (mg · mL<sup>-1</sup>). \*\* Concentração do padrão ácido gálico (GAE) multiplicada por 10<sup>3</sup>. \*\* Nos pontos de dados onde não se visualizam barras de erro o desvio padrão foi menor que 5%.

Em elevadas concentrações, a atividade antioxidante tendeu a se estabilizar, alcançando até 81,67 % para o hidrolisado US, na concentração de 24,75 mg · mL<sup>-1</sup>. Para os hidrolisados EZ e MW os percentuais de redução do radical DPPH foram menores, chegando até 68,07 e 69,54 %, respectivamente. Certamente o hidrolisado sem diluição também possui esta propriedade bioativa.

Os valores de  $IC_{50}$  (concentração da amostra seca necessária para 50% de inibição do radical DPPH) determinados para os hidrolisados foram: EZ (3,7 mg · mL<sup>-1</sup>), US (2,3 mg · mL<sup>-1</sup>), MW (5,0 mg · mL<sup>-1</sup>). Embora estes sejam menores que a atividade determinada para o padrão de ácido gálico  $IC_{50} = 1,25 \cdot 10^{-3}$  mg · mL<sup>-1</sup>, são relevantes. O ácido gálico é um forte antioxidante, mesmo se comparado com vários outros antioxidantes, sejam naturais ou até mesmo artificiais. São reportados na literatura valores de  $IC_{50}$  de 2 µg · mL<sup>-1</sup> para o ácido gálico, 10 µg · mL<sup>-1</sup> para o trolox, 12 µg · mL<sup>-1</sup> para o BHA (mistura de 2 isômeros: 2 e 3-terc-butil-4-hidroxianisol), 20 µg · mL<sup>-1</sup> para o ácido ascórbico e 45 µg · mL<sup>-1</sup> para o BHT (hidroxitolueno butilado) (PIRES et al., 2017; SHARMA et al., 2017; KSHETRI et al., 2019).

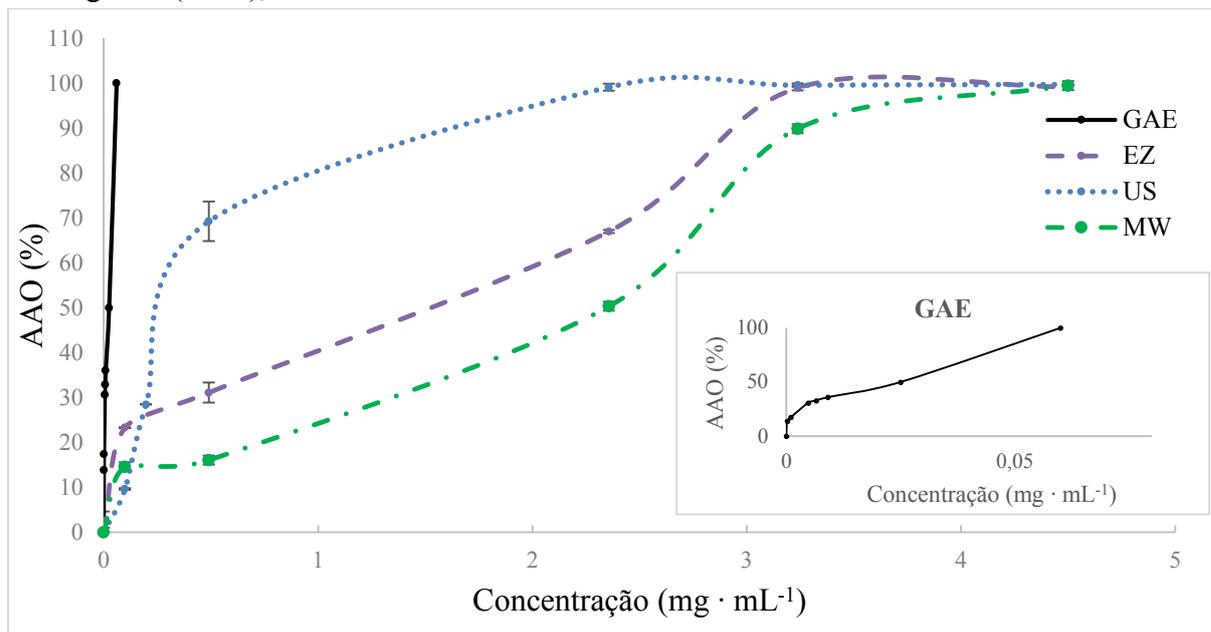
É crescente o interesse na substituição do uso de antioxidantes sintéticos como o BHA e o BHT por antioxidantes naturais para conservação de alimentos. O BHA e o BHT são amplamente utilizados pela indústria para prevenção da oxidação lipídica, em alimentos para animais e para humanos, medicamentos, bem como em cosméticos para os cabelos, batons e maquiagens em geral (ASNAASHARI, FARHOOSH, SHARIF, 2014). Se usado para adição em rações, por exemplo, alimentos para animais de estimação, o hidrolisado apresentará o poder de reduzir sua oxidação. O hidrolisado apresentou  $IC_{50}$  médio de  $3,67 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  frente ao radical DPPH comparando com padrões como o BHA, BHT, o hidrolisado tem o potencial antioxidante equivalente a 0,33 % e 1,23 %, respectivamente. No entanto, os antioxidantes químicos são considerados carcinogênicos (BOTTERWECK, et. Al, 2000) sendo possível sua substituição pelo hidrolisado, que além do potencial antioxidante, não é artificial e contém nutrientes de fácil absorção intestinal ou poder de penetração na pele e cabelos, devido aos peptídeos de pequeno tamanho.

Kshetri et al. (2019) determinaram um  $IC_{50} = 0,102 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  para hidrolisado de penas,  $IC_{50}$  menor que o encontrado nesta pesquisa (2,3 a  $5,0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). Alahyaribeik e Ullah (2020), determinaram um  $IC_{50} = 0,533 \pm 0,061 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  em queratina extraída de penas de frango por métodos químicos.

Por outro lado, as comparações exatas entre valores de pesquisas não podem ser feitas diretamente pois há variações entre as metodologias usadas, quando não, as concentrações das soluções utilizadas variam, ou diferentes proporções de volume da diluição da amostra e da solução do radical DPPH são usados. Kshert et al. (2019) usaram metodologia similar e uma proporção de 0,1 mL de diluição da amostra, para 1,9mL de solução de DPPH em concentração próxima da usada neste trabalho, porém aqui, para 0,1 mL da diluição foi utilizado uma maior quantidade de solução de DPPH (3,9 mL), logo existiu uma quantidade maior de radicais para serem reduzidos pela amostra, necessitando assim de maior concentração de amostra para exercer a ação antioxidante. Outra diferença foi que estes autores usaram como padrão o ácido ascórbico. Já Alahyaribeik e Ullah (2020) usaram como padrão o ácido ascórbico que tem poder antioxidante menor que o ácido gálico, além disso o  $IC_{50}$  foi maior, indicando que precisaram de maior volume de amostra para redução do radical, então a grosso modo, a queratina por eles extraída tem poder antioxidante menor que dos hidrolisados da pesquisa atual.

Os resultados da Figura 22 referem-se à determinação da atividade antioxidante do radical  $ABTS^{*+}$ , realizada para as diluições das amostras e para de uma solução estoque de ácido gálico ( $0,1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ).

Figura 22 - Porcentagem de atividade antioxidante (% AAO) e IC<sub>50</sub> das amostras e do padrão ácido gálico (GAE), frente ao radical ABTS<sup>•+</sup>.



Fonte: Elaborada pela autora (2020). \* Concentrações expressas em base seca (mg · mL<sup>-1</sup>). \*\* Nos pontos de dados onde não se visualizam barras de erro o desvio padrão foi menor que 5%.

Para os três hidrolisados, EZ, US e MW, na concentração de 4,5 mg · mL<sup>-1</sup>, todo o radical ABTS<sup>•+</sup> foi reduzido, descolorindo a mistura reativa, levando à absorbância nula a 734nm. Neste ponto o potencial antioxidante atingiu 100%. Os IC<sub>50</sub> determinados para EZ, US e MW foram 1,5; 0,25 e 2,3 mg · mL<sup>-1</sup>, respectivamente. O hidrolisado submetido ao ultrassom teve poder antioxidante maior, tanto nos ensaios pelo DPPH<sup>•+</sup> quanto pelo ABTS<sup>•+</sup>, que os hidrolisados EZ e MW. Isto pode estar associado à modificação ou exposição de grupos na molécula dos peptídeos bioativos formados, cujo potencial redutor seja maior.

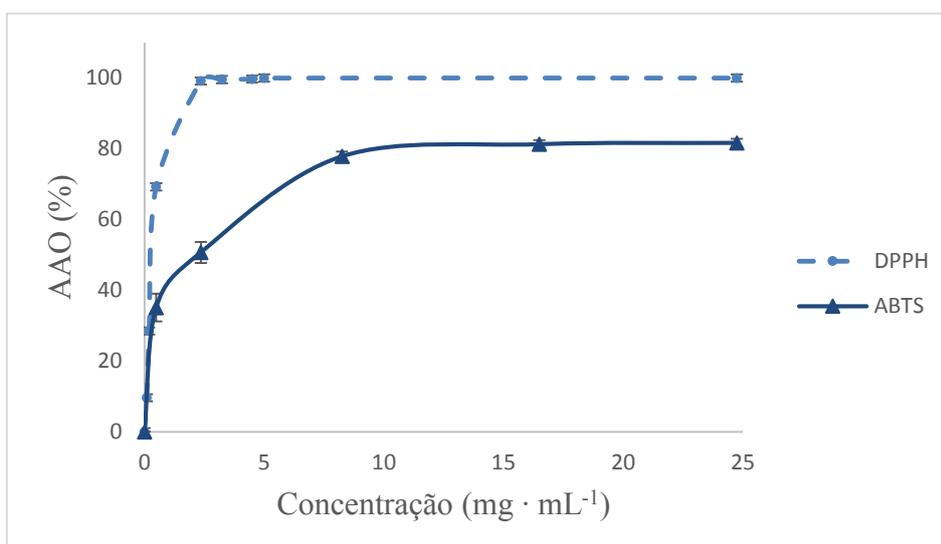
Hidrolisados de escamas de corvina (*Pseudosciaena crocea*) mostraram potencial antioxidante frente ao radical ABTS, com IC<sub>50</sub> variando entre 0,210 e 0,421 mg · mL<sup>-1</sup> (WANG et al., 2013). Estes também obtiveram valores de IC<sub>50</sub> maiores para DPPH (0,28-1,27mg · mL<sup>-1</sup>) do que os dos ensaios com ABTS. Ressalta-se que os potenciais foram determinados utilizando ácido ascórbico como padrão, cujo poder antioxidante é menor.

Observa-se pela Figura 22 que a atividade antioxidante do ácido gálico foi superior, com IC<sub>50</sub> 0,025 mg · mL<sup>-1</sup>, assim como no ensaio com DPPH<sup>•+</sup>.

Os peptídeos produzidos têm potencial para eliminar radicais de DPPH<sup>•+</sup> e ABTS<sup>•+</sup> com IC<sub>50</sub> (média EZ, US, MW) igual a 3,67 mg · mL<sup>-1</sup> e 1,35 mg · mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Sendo assim, apresentou maior potencial frente ao radical ABTS<sup>•+</sup>, cuja redução chegou a 100 %,

enquanto que para o DPPH<sup>•+</sup> a redução máxima foi até 81 % (Figura 21). Hidrolisados de pena produzidos por tratamento químico (SHARMA et al., 2017), também foram mais eficientes na eliminação do radical ABTS<sup>•+</sup>. A atividade antioxidante do hidrolisado de penas foi maior que as determinadas pelos autores nas duas metodologias (DPPH e ABTS), uma vez que foi necessária uma quantidade menor de amostra para reduzir os radicais. A Figura 23 ilustra os resultados obtidos no presente estudo. Assim, os peptídeos de queratina de penas de frango podem reagir com radicais DPPH<sup>•+</sup> e ABTS<sup>•+</sup> livres para interromper ou diminuir a reação em cadeia destes radicais e convertê-los em produtos menos prejudiciais à saúde ou à qualidade de produtos passíveis de oxidação lipídica.

Figura 23 - Atividade antioxidante do hidrolisado de queratina de penas de frango para os radicais ABTS<sup>•+</sup> e DPPH<sup>•+</sup>.



Fonte: Elaborada pela autora (2020). \* Nos pontos de dados onde não se visualizam barras de erro o desvio padrão foi menor que 5%.

### 5.7.5 Propriedades estruturais

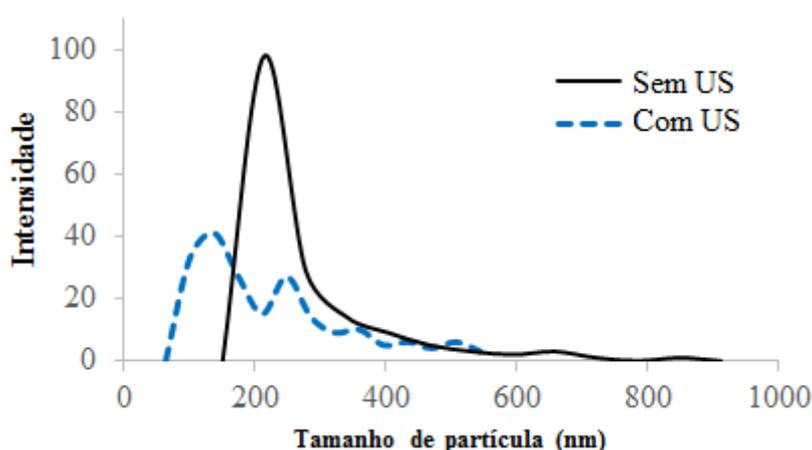
Na análise do tamanho de partículas, inicialmente foi realizado um comparativo entre as amostras provenientes da etapa de dissolução química: controle (sem ser submetida ao ultrassom) e com tratamento de ultrassom (50 mL; 450 W ; 12,5 min) imediatamente antes do procedimento da análise no Lumisizer (Tabela 16; Figura 24) e sem a etapa seguinte de hidrólise enzimática:

Tabela 16 - Dados da análise de tamanho de partículas do solubilizado (controle) e solubilizado com tratamento de ultrassom (SL-US).

Amostra	Média (nm)	Span (x90-x10)/x50	10% ≤ (nm)	16% ≤ (nm)	50% ≤ (nm)	84% ≤ (nm)	90% ≤ (nm)	Menor tamanho de partícula	Maior tamanho de partícula
Controle	194,9	0,7849	163,3	167,1	193,7	323,0	404,2	150,7	911,8
SL-US	155,1	1,743	88,9	99,0	172,2	151,8	387,1	63,7	542,7

Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Figura 24 - Comparativo da distribuição do tamanho de partículas do solubilizado sem e com tratamento com ultrassom.



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Na Figura 24 observa-se que a média de tamanho de partículas para as penas dissolvidas quimicamente sem a ação do ultrassom (controle) foi 194,9 nm (variando entre a menor partícula registrada 150,7 nm e a maior 911,8 nm). Para as amostras tratadas por ultrassom (SL-US), as partículas variaram entre 63,7 e 542,7 nm, com média 155,1 nm. Assim, o ultrassom foi eficaz para reduzir o tamanho de partículas, e facilitar a ação posterior da enzima. Segundo Arzeni et al. (2012), o ultrassom gera fragmentação de grandes agregados em tamanhos menores das partículas. A fragmentação é associada a maior ação ou acesso da enzima sobre as partículas, sendo uma explicação plausível para os maiores graus de hidrólise, até nas primeiras horas da enzimólise, encontrados para as amostras que foram submetidas ao ultrassom no presente estudo.

Eslahi et al. et al (2014), produziram nanopartículas de penas com 243 h de hidrólise enzimática, seguidas de tratamento ultrassônico, a fim de atingir o menor tamanho de partículas, onde o tamanho médio passou de 297 a 127 nm após o tratamento ultrassônico. Em

contrapartida, no presente trabalho, os resultados foram atingidos em menor tempo total de processo, 16 h (etapa química por 8 h + etapa enzimática por 8 h), muito embora o ultrassom não tenha sido utilizado com o objetivo principal de diminuição do tamanho das partículas e sim como tecnologia de pré-tratamento para facilitar a hidrólise enzimática, visando a formação de um hidrolisado líquido, ao qual podem ser atribuídas propriedades nutricionais, bioativas ou tecno-funcionais.

As propriedades físicas e estruturais das proteínas podem mudar pela ação mecânica do ultrassom. Jambrak et al. (2014) verificaram uma diminuição do tamanho das partículas, redução de sua distribuição e aumento da superfície livre específica com aplicação do ultrassom em proteínas do soro de leite. Segundo estes autores, as alterações estruturais induzidas em proteínas pelo ultrassom estão associadas à clivagem parcial das interações hidrofóbicas intermoleculares, em vez de ligações peptídicas e dissulfeto. Quando as partículas são submetidas ao cisalhamento, aumentam as colisões, reduzindo o tamanho das partículas. A sonicação não tem efeito sobre a carga superficial, mas aumenta a superfície livre no material. As vibrações do sonificador ultrassônico e as forças da cavitação podem causar essas alterações. A cavitação é eficaz na quebra de agregados e aglomerados, diminuição das forças de Van Waals, fazendo as partículas menores.

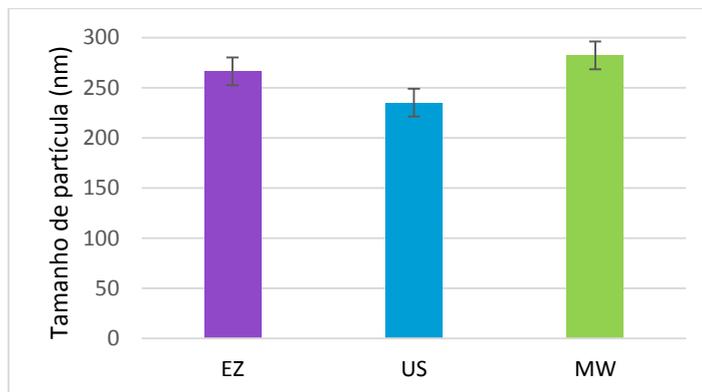
Segundo Shaw (1992) as dispersões coloidais têm tamanho médio de partículas que varia de 1 a 1000nm. O hidrolisado final apresentou característica homogênea e sem formação de sedimentos ou aglomerados. Com base nestas características e no tamanho das partículas (Tabela 17) o hidrolisado pode ser classificado como uma dispersão coloidal. Como as partículas dispersas tiveram tamanhos diferentes, o sistema coloidal é polidisperso.

Tabela 17 - Dados da análise de tamanho de partículas dos hidrolisados (EZ, US e MW).

Amostra	Média (nm)	Span (x90- x10)/x50	10% ≤ (nm)	16% ≤ (nm)	50% ≤ (nm)	84% ≤ (nm)	90% ≤ (nm)
EZ	266,3	2,3	120,5	155,0	365,1	755,5	884,4
US	235,0	2,0	108,9	132,2	318,5	661,2	753,2
MW	282,1	2,5	142,5	168,5	358,6	777,8	904,6

Fonte: Elaborada pela autora (2020). n= 3 repetições por tratamento; médias seguidas de letras minúsculas diferentes sobrescritas nas linhas indicam haver diferença significativa entre os tratamentos em nível de 5 % por teste de Tukey.

Figura 25 - Comparativo do tamanho médio de partículas dos três hidrolisados (EZ, US e MW).



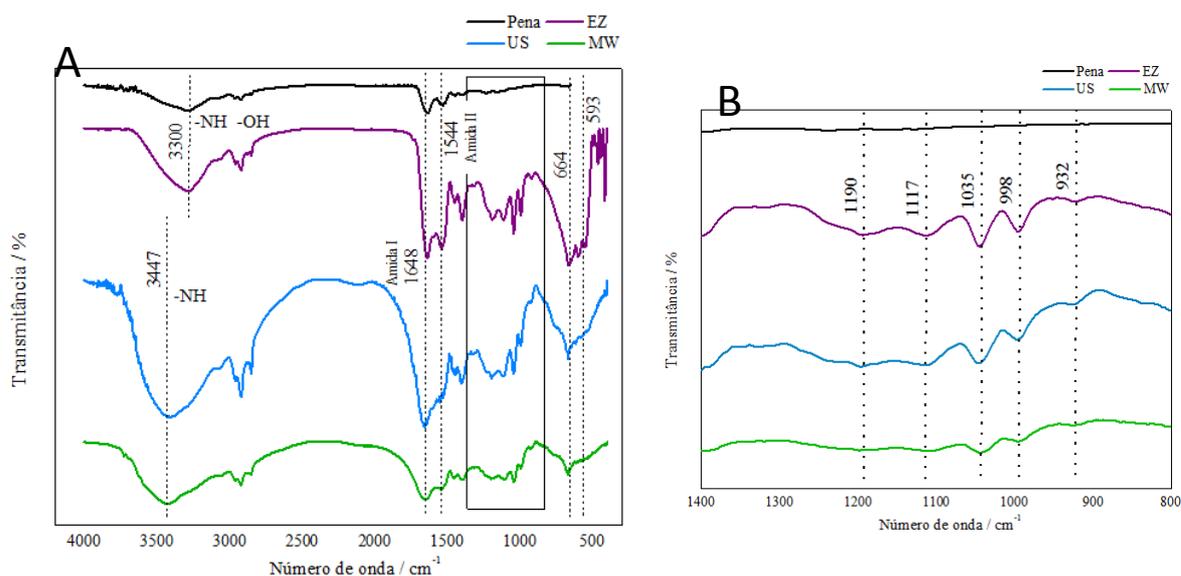
Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Apesar do hidrolisado US ter apresentado menores valores relacionados ao tamanho de partículas, a diferença entre as médias de EZ, US e MW não foi significativa ( $\alpha = 0,05$ ). Quando comparados os spans dos três hidrolisados finais, o US teve menor valor de span (2,0), o que estaria relacionada à uma distribuição menos heterogênea do tamanho das partículas.

É importante um olhar quanto à característica de produto com tamanho próximo ao de nanomateriais que, por definição ou recomendação da União Europeia (2011/696 / EU), são aqueles onde 50 % ou mais das partículas têm tamanho entre 10 e 100 nm, visto que materiais com nanopartículas são atualmente investigados e aplicados em diversos tipos de produtos, tais como cosméticos, alimentos e medicamentos (PETERS et al., 2014).

Os espectros de FTIR-ATR das penas de frango trituradas, do hidrolisado enzimático de penas (EZ), e dos hidrolisados enzimáticos obtidos após ultrassom (US) e após o microondas (MW) estão apresentados na Figura 26.

Figura 26 - Espectros FTIR-ATR das penas e hidrolisados (EZ, US e MW). A – Espectro total; B – Zoom na faixa 1400 a 800  $\text{cm}^{-1}$



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

A interpretação dos espectros de FTIR-ATR das penas integras e da queratina extraída e tratada por diferentes tecnologias revelou diferenças espectrais que são características de ligações peptídicas. Os picos de absorção em  $3300 \text{ cm}^{-1}$  presentes no espectro da pena e do hidrolisado EZ são característicos de grupamentos de  $-\text{NH}$  e  $-\text{OH}$  associados. Após tratado por ultrassom e micro-ondas houve deslocamento angular para  $3447 \text{ cm}^{-1}$ , provavelmente, devido à quebra de ligações peptídicas, com formação de  $-\text{NH}$  livres em amidas. A banda de  $1648 \text{ cm}^{-1}$  presente em todos os espectros, corresponde a banda da amida I referente as vibrações de alongamento  $\text{C}=\text{O}$  (MOHANTY et al., 2005).

A banda da região  $1544 \text{ cm}^{-1}$  característica de amida II que está presente na pena e no EZ não estão evidentes nas amostras US e MW, sendo relativa às vibrações de flexão de  $-\text{NH}$  e alongamento de  $-\text{CH}$  (ALAHYARIBEIK, ULLAH, 2020).

Verifica-se mudanças na faixa do espectro entre  $1200$  e  $900 \text{ cm}^{-1}$  onde, no espectro da pena não haviam picos, surgindo picos adicionais de números de onda  $1190$ ,  $1117$ ,  $1035$ ,  $998$  e  $932 \text{ cm}^{-1}$  em EZ, US e MW, aos quais pode estar associada a formação de peptídeos com exposição de extremidades  $-\text{C}-\text{N}$  (peptídeos com aminoácidos alifáticos), liberação de resíduos de cisteína sulfonada e/ou resíduos reticulados com maior massa molecular. O aparecimento destes picos evidencia o processo de hidrólise, e sulfitolise que representa reação entre o sulfito inorgânico adicionado ao meio e resíduos de cisteína. Os hidrolisados têm vários picos adicionais em comparação com a pena, sugerindo proteínas de menor massa molecular. A

presença de bandas em  $664\text{ cm}^{-1}$  nas amostras hidrolisadas indica que, provavelmente, houve exposição de cadeias cíclicas alifáticas de tri ou oligopeptídeos. Também a formação de bandas em  $593\text{ cm}^{-1}$  que pode indicar presença de dissulfeto de reticulação. Semelhanças com estas considerações foram encontradas no trabalho de Alahyaribaik e Ullah (2020).

### 5.7.6 Solubilidade proteica (SP)

Foram testados diferentes pH's do hidrolisado para avaliar a solubilidade das proteínas (aminoácidos e peptídeos) nele contidas. É sabido (FENNEMA,1993) que no ponto isoelétrico, as cargas positivas e as negativas entram em equilíbrio, e neste ponto os aminoácidos, peptídeos ou proteínas têm uma carga líquida igual a zero e têm baixa solubilidade. Ao adicionar uma maior quantidade do HCl a solução tornou-se turva, decantando após centrifugação. Associando-se este fenômeno e os resultados de proteína solúvel (Tabela 18), o hidrolisado apresentou menor solubilidade em pH's iguais ou abaixo de 6. Este resultado é condizente com a literatura uma vez que grande parte dos aminoácidos e proteínas possuem ponto isoelétrico ácido, a exemplo os aminoácidos serina (pI= 5,68), glicina (pI = 6,06), valina (pI = 5,97) (FENNEMA,1993); e a faixa do pH do ponto de carga zero da queratina de 3,9 a 6,5 (GIACOMNI et al., 2017).

Tabela 18 - Proteína solúvel dos hidrolisados de queratina de penas de frango (EZ, US e MW) em diferentes pH's.

pH	Proteína solúvel ( $\text{g} \cdot 100\text{ mL}^{-1}$ )		
	EZ	US	MW
2,0	2,80 <sup>Aa</sup> ± 0,11	3,32 <sup>Ab</sup> ± 0,02	2,85 <sup>Aa</sup> ± 0,00
4,0	3,19 <sup>Ba</sup> ± 0,14	3,70 <sup>Bb</sup> ± 0,00	3,09 <sup>Ba</sup> ± 0,06
6,0	3,27 <sup>Ca</sup> ± 0,12	3,73 <sup>Cb</sup> ± 0,00	3,15 <sup>Ba</sup> ± 0,01
8,0	3,31 <sup>Ca</sup> ± 0,10	3,75 <sup>Db</sup> ± 0,00	3,24 <sup>Ca</sup> ± 0,02

Fonte: Elaborada pela autora (2020). n= 3 repetições por tratamento; Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na coluna e minúscula na linha, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Observa-se ainda que o tratamento com ultrassom (US) diferiu estatisticamente do EZ e do MW em todos os pH's testados, indicando que o hidrolisado US apresentou solubilização das proteínas maior que os demais tratamentos. Pode-se associar o aumento proporcional da solubilidade com o aumento do GH, uma vez que o GH do hidrolisado US foi 10,8%, enquanto que do EZ e MW foi 8,4%. O mesmo foi observado por Roman e Sgarbieri (2005), em que os hidrolisados de caseína com maiores GH's apresentaram maior solubilidade. Em ambos os

trabalhos a hidrólise não precisou ser total, com valores abaixo de 40 %. A hidrólise parcial é uma estratégia quando a redução da massa molecular e/ou uma alta solubilidade é requerida (COLTELLI et al., 2016).

Fazendo-se uma comparação entre a proteína total e a proteína solúvel dos hidrolisados (pH 8,0): EZ (3,81 x 3,31 %), US (3,75 x 3,75) e MW (3,69 x 3,24%), em suma, a proteína solúvel foi similar à proteína total confirmando que o material proteico (peptídeos) contido nos hidrolisados é muito solúvel no meio, isto é, tem boa solubilidade proteica no meio aquoso do hidrolisado (Tabela 18). Assim o hidrolisado final dessa pesquisa teve seu pH ajustado para 7,5 - 8,0, pois além de ter um produto próximo à neutralidade, esta condição evita precipitação da proteína nele contida, dando estabilidade e maior vida de prateleira ao mesmo. Para tal não foi preciso adicionar grandes quantidades de ácido uma vez que, ao final da enzimólise o pH apresentou-se em torno de 9.

Os resultados na Tabela 19 reforçam o que foi dito anteriormente em relação à maior solubilidade da proteína contida no hidrolisado US:

Tabela 19 - Solubilidade proteica dos hidrolisados de queratina de penas de frango (EZ, UZ e MW).

pH	Solubilidade proteica – SP (%)		
	EZ	US	MW
8,0	86,87	100,00	87,80

Fonte: Elaborada pela autora (2020).

### 5.7.7 Capacidade emulsificante (CE)

A análise da capacidade emulsificante do hidrolisado foi realizada para avaliar sua propriedade de proporcionar a mistura de substâncias imiscíveis (água e lipídeos) naturalmente presentes em formulações alimentícias e cosméticas. Uma forma simples de analisar esta propriedade foi avaliando seu comportamento em óleo porque, naturalmente, não se misturam e, por terem densidades diferentes à 25 ° C, 1 atm (água, 0,9970 g · cm<sup>-3</sup> e óleo de soja 0,92020 g · cm<sup>-3</sup>), o óleo posiciona-se na fase superior (HANDBOOK OF CHEMISTRY AND PHYSICS, 2017). Quando estão sendo emulsificados, se estabilizam até um certo limite onde o volume de óleo adicionado não mais se incorpora na fase aquosa, ocorrendo um colapso da emulsão e separação das fases. Assim, pela quantidade máxima de óleo que foi dispersa no hidrolisado (fase aquosa), foi determinada a CE.

O ponto onde ocorreu a inversão das fases com colapso da emulsão, foi tomado para o cálculo da capacidade emulsificante (CE), que foi expressa pela razão entre o volume de óleo (ml) estabilizado, por cada grama (1 g) de proteína (Tabela 20):

Tabela 20 - Capacidade emulsificante dos hidrolisados de queratina de penas de frango (EZ, US, MW).

Amostra	CE (mL · g <sup>-1</sup> )	CE Média (mL · g <sup>-1</sup> )
EZ	14,75 <sup>a</sup> ± 1,9	
US	14,00 <sup>b</sup> ± 1,0	14,47 ± 0,41
MW	14,67 <sup>c</sup> ± 1,53	

Fonte: Elaborada pela autora (2020). CE por grama de proteína (diluição do hidrolisado com 1% de proteína). n = 3 repetições por tratamento; médias seguidas de letras minúsculas diferentes sobrescritas indicam haver diferença significativa entre os tratamentos em nível de 5%, por teste de Tukey.

Esta estabilização ocorreu em pH 7,5, para diluições 1 % de proteína. Logo 100mL do hidrolisado integro teria CE próxima de 54,27 (para as 3,75g de proteína nele contida). Como o hidrolisado tem alto teor de água, grande parte dela se separa após repouso. Uma sugestão para uso com intuito de emulsificação seria fazer um processo de concentração com membranas. Assim, a proteína seria concentrada, resultando em maior CE e menor fração de água restante.

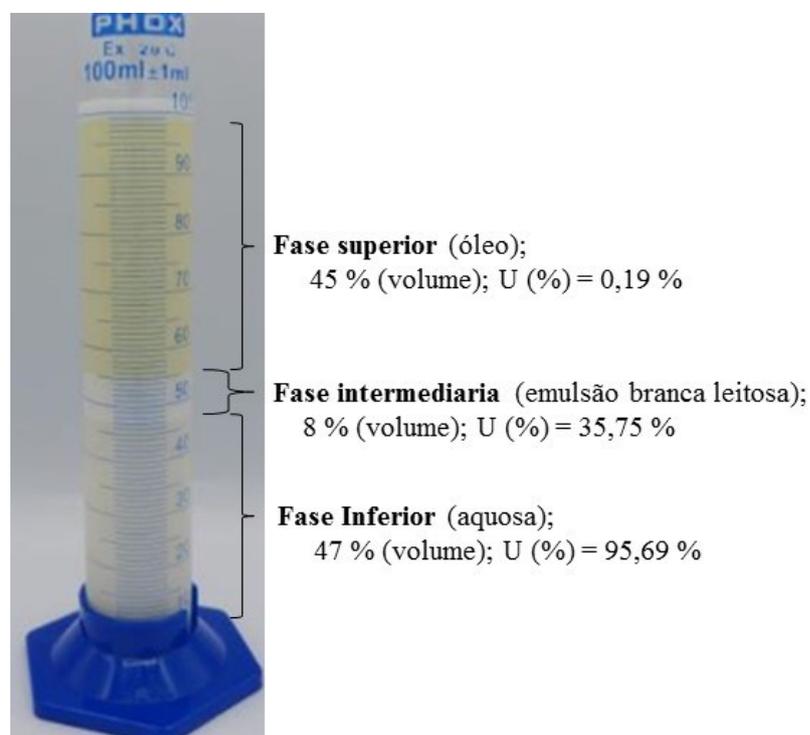
A proteína presente no hidrolisado, tem características hidrofílicas por ser solúvel em água, porém este não é fator único que determine sua interação com lipídeos. A metodologia aqui usada, seguiu estudo de DE KANTEREWICZ, R. J.; et al. (1987), que apoiaram o conceito de que a capacidade emulsificante de proteínas depende do equilíbrio adequado entre as suas características hidrofílicas e lipofílicas, em vez de apenas valores altos para cada um.

Em pesquisa de Chiu, Chen, Chang (2009), o soro do leite e o concentrado de soja dispersaram, por grama de amostra, 1,70 e 2,18 mL de óleo. Já o hidrolisado de queratina de penas absorveu 14,47 mL de óleo por grama de proteína, ou por equivalentes 26,7 g de hidrolisado, que daria uma incorporação de 0,5 mL de óleo por grama de amostra (considerando que o hidrolisado tem 3,75 % de proteína). Assim, a capacidade emulsificante do soro do leite foi 3 vezes maior que a do hidrolisado, já do concentrado de soja foi 4 vezes maior.

### 5.7.8 Estabilidade da emulsão (EE)

A estabilidade das emulsões foi analisada após as mesmas permanecerem em repouso por 24 horas. Após esse período observou-se separação da emulsão em três fases distintas (Figura 27): 47 % na parte inferior do recipiente (fase aquosa e translúcida), 8 % na parte intermediária (fase de aspecto opaco, cremoso ou leitoso), e 45 % na parte superior (fase oleosa de cor amarela aparente).

Figura 27 - Separação e composição das fases 24h após emulsificação óleo de soja – hidrolisado de queratina



Fonte: Elaborada pela autora (2020). Hidrolisado diluído (1 % de proteína).

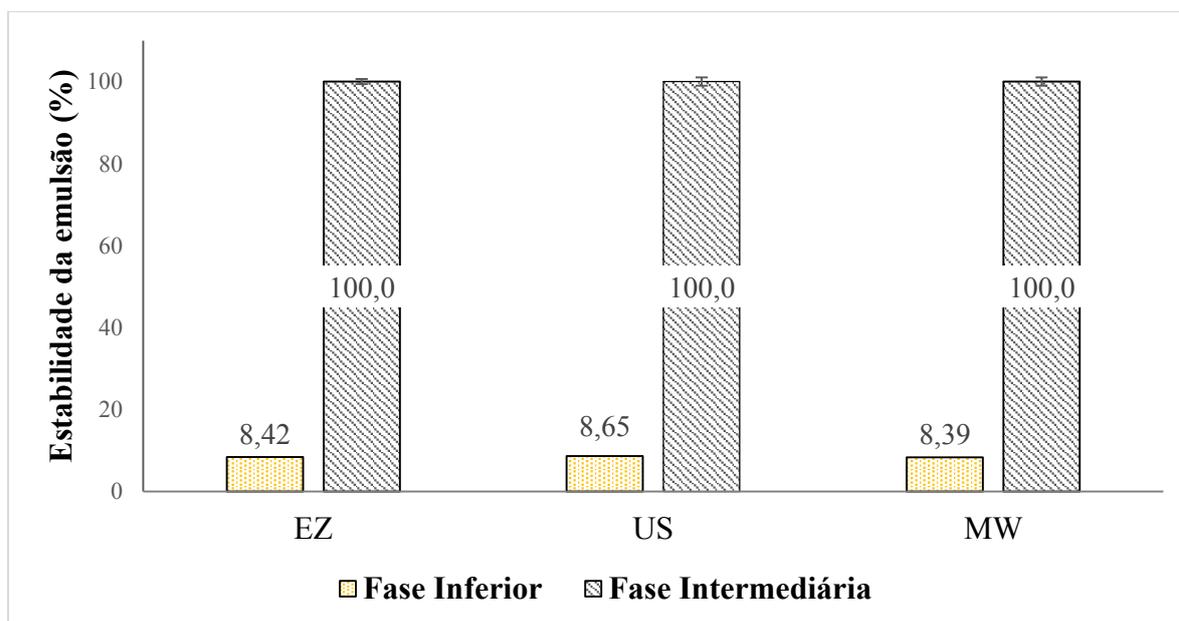
No procedimento descrito por Acton e Saffle (1970) para determinação da estabilidade da emulsão, faz-se menção à retirada de uma alíquota de 5 mL da fase inferior. Pressupõe-se a existência de apenas duas fases, já no presente experimento formaram-se três fases. Como a fase inferior foi visivelmente aquosa e que provavelmente incorporou pouco ou nenhum óleo, além da coleta desta fase, também foi realizada a coleta de 5 mL da fase intermediária.

A pouca existência de óleo observada para a fase inferior foi confirmada comparando-se os resultados de estabilidade da emulsão hidrolisado proteico/óleo expostas na Figura 28.

Considerando as fases inferiores, a estabilidade da emulsão foi baixa e não diferiu estatisticamente ( $\alpha = 0,05$ ) para os três tratamentos: EZ (8,42 %), US (8,65 %) e MW (8,39%), estas tiveram em média 95,69 % de umidade, confirmando ser fase aquosa.

Ao avaliar-se a fase intermediária, os valores da estabilidade da emulsão (100 %), indicam que houve a formação de uma fase estável que continha em média 35,75 % de umidade. Esta fase foi composta majoritariamente por óleo (62,5 %) e 37,5 % da dispersão de proteína em água (diluição do hidrolisado com 1% de proteína). Sendo que, do volume total de 50 mL de hidrolisado diluído, aproximadamente 3 mL emulsificaram 5 mL de óleo de soja, totalizando 8 mL de emulsão (fase intermediária). Ou seja, a diluição do hidrolisado (com 1% de proteína), incorpora aproximadamente 10 % do seu volume em óleo. Analogamente o hidrolisado integro (3,75 % de proteína) incorpora 37,5 % do seu volume em óleo de soja. Estas quantidades foram condizentes com a calculada na análise de CE, cujo valor médio foi  $14,47 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$  para a diluição (com 1% de proteína).

Figura 28 - Estabilidade da emulsão (%) para os três hidrolisados EZ, US e MW.



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

A presente metodologia para classificação de estabilidade de emulsões óleo em água, foi realizada de acordo com Acton e Saffle (1970) que analisaram a estabilidade de emulsões contendo 50 % óleo, estabilizado por proteínas de carnes solúveis em sal (carne bovina e suína, coração de bovino, bochecha bovina e suína), encontrando valores de estabilidade de emulsão que variaram entre 7,4 e 98,5 %, dependente do tipo de carne e da concentração de proteínas

nas dispersões. Foi observado que, quanto maior a concentração de proteínas, maior foi a EE %. Por exemplo: concentrações de  $7,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , apresentaram mais de 95 % de estabilidade da emulsão. Para a concentração de 1 % de proteínas preparada no presente experimento com a queratina hidrolisada, ou seja, de  $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , foi calculada uma menor estabilidade (8,49 %). No entanto cabe ressaltar que, para a fase intermediária emulsificada, foi calculada estabilidade de 100%, e esta fase perdurou estável por 8 dias.

Em termos de aplicação, concerne avaliar o uso do hidrolisado como emulsificante em formulações cosméticas ou como emulsificante natural em alimentos para humanos e animais, com destaque para alimentos com gordura e sais como derivados cárneos e alimentos prontos para pets. Este hidrolisado teria vantagem frente aos emulsificantes artificiais. Logo, poderia ser utilizado como emulsificante natural, com proteínas de alta digestibilidade, antioxidante, aliando propriedades tecnológicas, nutricionais e bioativas.

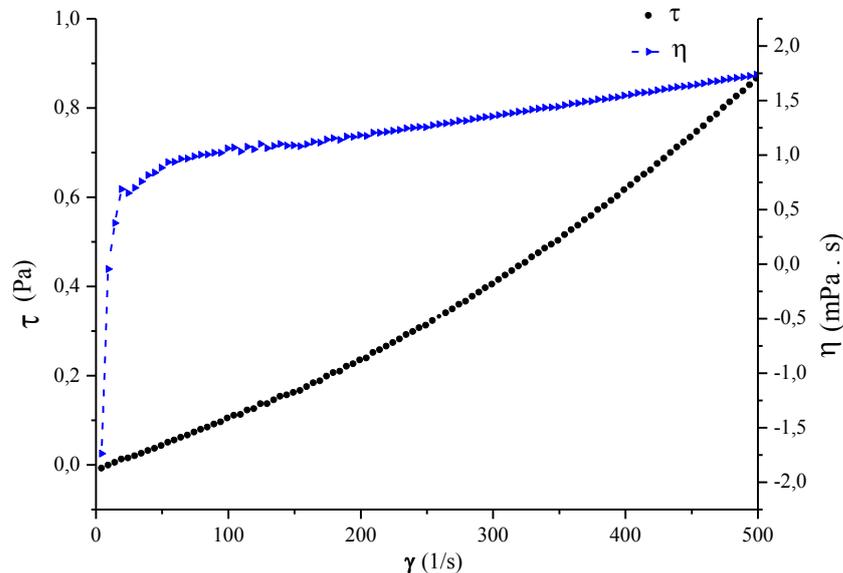
Durante a ação do ultra-turrax foi verificada a formação da espuma no hidrolisado, assim seria interessante investigar sua atuação acerca de propriedades espumantes.

#### 5.7.9 Densidade, viscosidade e índice de refração

Neste item estão apresentados os resultados de análises adicionais para caracterização geral do hidrolisado. A densidade absoluta determinada foi  $1,12 \pm 0,01 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Esta densidade é um pouco superior à da água,  $0,9970 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , à mesma temperatura  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , na pressão de 1 atmosfera (HANDBOOK OF CHEMISTRY AND PHYSICS, 2017), sendo já esperado visto que os sólidos solúveis no hidrolisado, como peptídeos e sais, provocariam este aumento.

A análise de viscosidade foi feita com 100 medidas e taxa de cisalhamento 0 - 500 (1/s), medindo-se a tensão de cisalhamento que foi de 0 a 0,9 Pa (Figura 29).

Figura 29 - Viscosidade –  $\eta$  - ( $\text{mPa} \cdot \text{s}$ ) do hidrolisado de queratina de penas de frango frente à taxa de cisalhamento –  $\gamma$  - ( $1/\text{s}$ ) e tensão de cisalhamento -  $\tau$  - (Pa).



Considerando-se a Lei de Newton da viscosidade (BRUNETTI, 2008), infere-se que o hidrolisado tem características de um fluido newtoniano, uma vez que a tensão de cisalhamento é proporcional ao gradiente de velocidade ou taxa de cisalhamento.

O hidrolisado é um fluido que não apresenta resistência ao escoamento. Sabe-se que a viscosidade da água à 22 °C é 0,9548  $\text{mPa} \cdot \text{s}$ , para o hidrolisado foi calculada uma viscosidade média maior, 1,24  $\text{mPa} \cdot \text{s}$  (HANDBOOK OF CHEMISTRY AND PHYSICS, 2017).

O índice de refração determinado foi 1,34 nD o equivalente a 5,4 ° Brix (à 25 °C). Estes seriam relativos aos 3,75 % de proteínas, sendo o restante, 1,65 % de outros sólidos solúveis como os sais.

#### 5.7.10 Cor do hidrolisado de queratina de penas de frango

Com o intuito de caracterizar a aparência visual do hidrolisado (Figura 30), foi observada a sua cor, que apresentou-se em amarelo claro e translúcido. Na figura 31 é apresentado o espectro de absorção da luz visível, onde os comprimentos de onda de máxima absorção foram na região abaixo de 440 nm. Sabe-se (SKOOG, HOLLER, CROUCH, 1998) que a cor absorvida é complementar à cor observada e que comprimentos de onda de 380 a 440 nm correspondem à violeta e violeta-azul, cuja cor complementar predominante observada é o

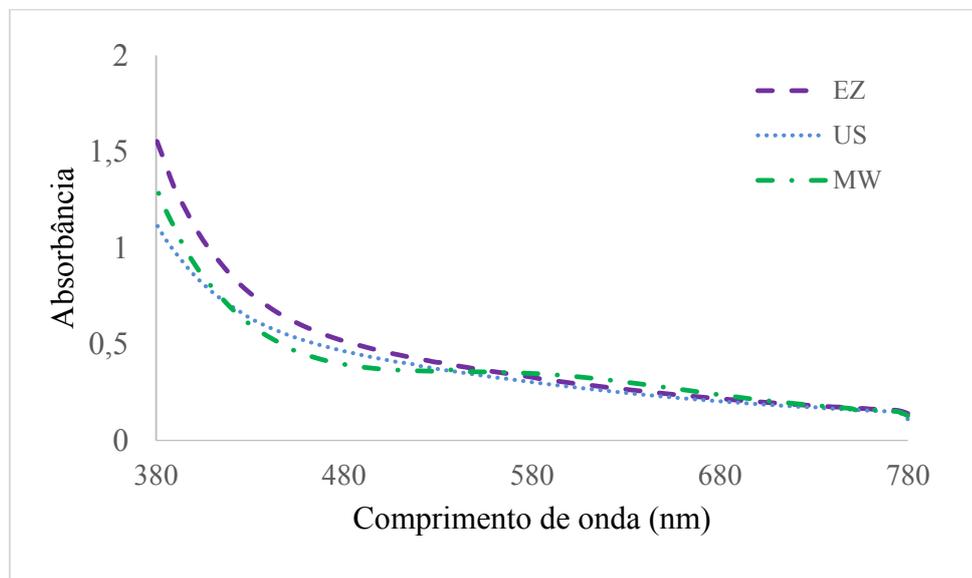
amarelo. Esta medida experimental realizada é justamente uma referência numérica à cor amarela observada à olho nu.

Figura 30 - Hidrolisado final de queratina de penas de frango.



Fonte : Arquivo pessoal da autora.

Figura 31 - Espectro de absorção da luz visível dos hidrolisados EZ, US e MW.



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

## 5.8 RESUMO DE PROPRIEDADES E APLICAÇÕES DO HIDROLISADO DE QUERATINA DE PENAS DE FRANGO

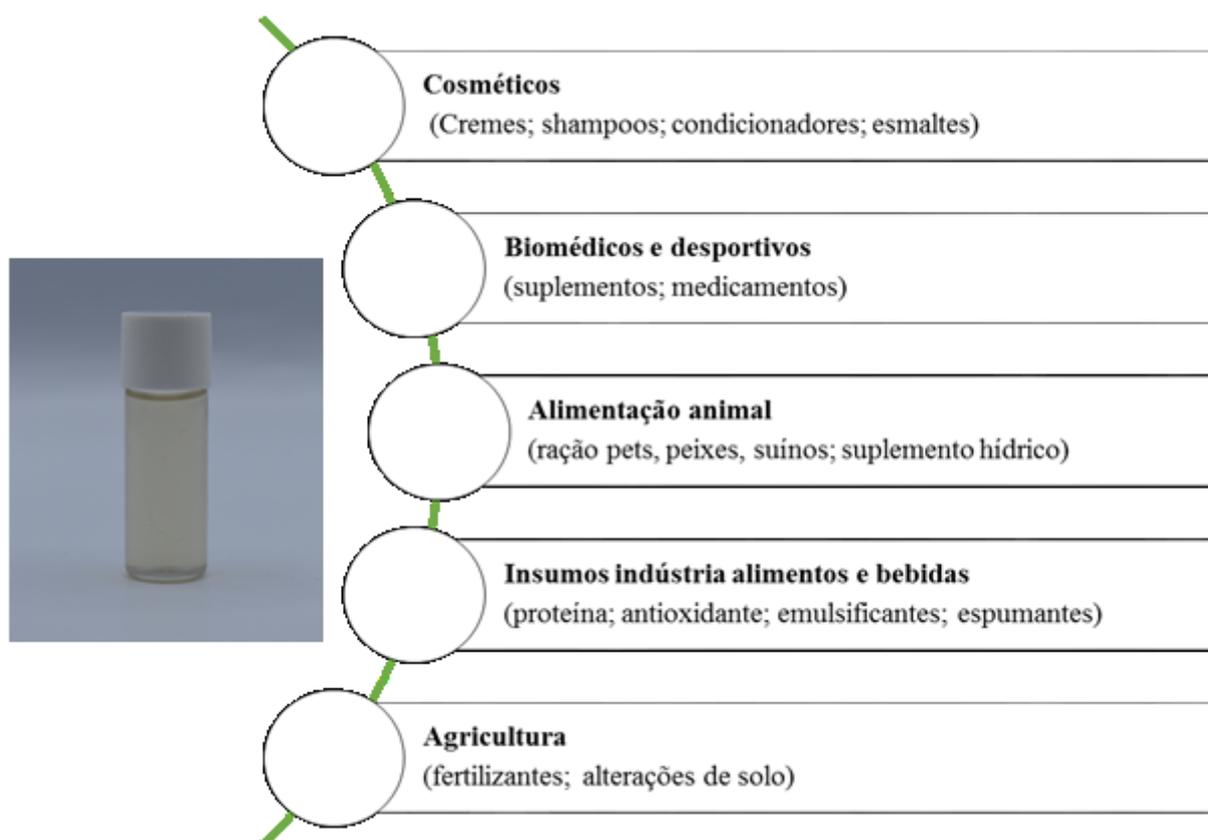
Com base em todos os resultados obtidos, conhecimentos adquiridos durante revisão de literatura e desenvolvimento deste trabalho, foi elaborado um resumo (Quadro 6) de características e algumas propriedades do produto obtido, bem como um desenho esquemático (Figura 32) de possibilidades de uso do hidrolisado em diversas aplicações, cuja viabilidade técnico-econômica pode ser estudada.

Quadro 6 - Características do hidrolisado de queratina de penas de frango.

Propriedade	
Aparência	Líquido translúcido
Cor	Amarelo claro
pH	7,5 a 8,0
Densidade	$1,12 \pm 0,01 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$
Viscosidade	1,24 mPa · s
Índice de refração	1,34 nD ou 5,4 ° Brix (à 25 °C)
Umidade	95,05 %
Matéria seca	4,95%
Teor de cinzas (base seca)	18,95 %
Proteína (base seca)	75,78 %
Solubilidade proteica	> 80%
Massa molecular média	Peptídeos < 1 kDa ( $1000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ )
Tamanho de partículas	< 300 nm
Digestibilidade proteica <i>in vitro</i>	89,28 %

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Figura 32 - Possibilidades de aplicação do hidrolisado de queratina de penas de frango.



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

## 6 CONCLUSÕES

Foi possível estabelecer uma metodologia amigável ao meio ambiente para dissolução e hidrólise enzimática de penas de frango, lhe agregando valor e com uso de enzima disponível no mercado.

O pré-tratamento da hidrólise enzimática com ultrassom foi significativo na enzimólise da queratina em comparação com a enzimólise tradicional, e com o pré-tratamento com micro-ondas. Sua aplicação teve efeito positivo na eficiência e eficácia do processo de hidrólise enzimática da queratina de penas de frango. Foi visto que, com aplicação do ultrassom (US) foi obtido maior grau de hidrólise (10,8 %), versus 8,4 % do tratamento enzimático (EZ) e 8,4 % do micro-ondas (MW); maior digestibilidade proteica (100 %), versus 80,23 % (EZ) e 87,60 % (MW); melhor solubilidade proteica com 100 % da proteína solúvel, contra 86,87 % (EZ) e 87,80 % (MW) e maior potencial antioxidante frente aos radicais DPPH<sup>•+</sup> e ABTS<sup>•+</sup>.

A metodologia de extração e hidrólise, e a tecnologia de ultrassom proporcionaram bons resultados na produção de hidrolisados de queratina de penas de frango, podendo ser adequada para a industrialização de outros resíduos proteicos.

O produto obtido é composto por peptídeos de baixa massa molecular e possui propriedades funcionais e nutricionais destacáveis tais como atividade antioxidante, boa solubilidade e digestibilidade proteica, partículas de tamanho menor que 300 nm passíveis de boa absorção.

Pelas características apresentadas, o produto tem potencial para uso na indústria de alimentos, cosmética, farmacêutica, bem como indústria de alimentação animal.

## 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar concentração e separação do hidrolisado e avaliar as propriedades das frações;
- Investigar a eficácia do hidrolisado por testes dermatológicos de eficácia *in vivo* com aplicação do mesmo em produtos cosméticos;
- Investigar viabilidade técnica e econômica da aplicação do hidrolisado em formulações alimentícias ou como ingrediente de alimentos para animais;
- Investigar o hidrolisado acerca de suas propriedades espumantes;
- Sequenciar os aminoácidos dos peptídeos obtidos e relacionar com sua bioatividade.

## REFERÊNCIAS

ACTON, J.C.; SAFFLE, R.L. Stability of oil-in-water emulsions. Effect of surface tension, level of oil, viscosity and type of meat protein. **Journal of Food Science**, Chicago, v.35, n.1, p.852-855, 1970.

ADJONU, R. et al. Whey protein peptides as components of nanoemulsions: A review of emulsifying and biological functionalities. **Journal of Food Engineering**, v.122, p.15 - 27, 2014.

ADLER, S. A. et al. In vitro pepsin digestibility and amino acid composition in soluble and residual fractions of hydrolyzed chicken feathers. **Poultry Science**, v. 0, p. 1 - 15, 2018.  
<http://dx.doi.org/10.3382/ps/pey175>

AHMED, S. R. Formulating halal foods. Formulation & Ingredient Challenges. **Prepared Foods**, v. 172, ed. 5, p. 101, 2003. Disponível em: <<https://link-gale.ez15.periodicos.capes.gov.br/apps/doc/A102270557/AONE?u=capes&sid=AONE&xid=37c2ce06>>; Acesso em: 31 jan. 2020.

ALAHYARIBEIK, S.; ULLAH, A. Methods of keratin extraction from poultry feathers and their effects on antioxidant activity of extracted keratin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.148, p.449 - 456, 2020.

ALMEIDA, C. C. et al. In vitro digestibility of commercial whey protein supplements. **LWT - Food Science and Technology**, v. 61, p. 7 - 11, 2015.

AMBROSI, V. et al. High hydrostatic pressure assisted enzymatic hydrolysis of whey proteins. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.38, p.294 - 301, 2016.

ANASTAS, P. T.; BEACH, E. S.; CUI, Z. Green Chemistry: a design framework for sustainability. **Energy & Environmental Science**, London, v. 2, n. 10, p. 1038 - 1049, 2009.

ARZENI, C. et al. Comparative study of high intensity ultrasound effects on food proteins functionality. **Journal of Food Engineering**, v.108, p.463 - 472, 2012.

ASNAASHARI, M.; FARHOOSH, R.; SHARIF, A. Antioxidant activity of gallic acid and methyl gallate in triacylglycerols of Kilka fish oil and its oil-in-water emulsion. Volume 159, p. 439-444, 2014.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL (ABPA). **Relatório Anual 2019**. São Paulo, 2019. Disponível em: < <http://abpa-br.com.br/storage/files/relatorio-anual-2019.pdf>>; Acesso em: 03 mar. 2020.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM). **Standard Test Method for Wool Content of Raw Wool - D 584**, 2005.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis**. Washington, 2012.

AZMI, N. A.; IDRIS, A.; YUSOF, N. S. M. Ultrasonic technology for value added products from feather keratin. **Ultrasonics – Sonochemistry**, v. 47, p. 99 - 107, 2018.

BADHANI, B.; SHARMA, N.; KAKKAR, R. Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. **RSC Advances**, v.5, p. 27540 - 27557, 2015.

BOTTERWECK, A. A. M., et al. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands Cohort Study. **Food Chem. Toxicol.** , v. 38, p. 599 - 605, 2000.

BRADFORD, M. **Analytical Biochemistry**. v.72, p. 248 - 254, 1976.

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

BRANSKA, B., et al. Feather and wheat straw hydrolysate for direct utilization in biobutanol production. **Renewable Energy**, v.145 (2020), p. 1941 - 948, 2019.

BRUNETTI, F. Mecânica dos fluidos. São Paulo: Pearson Prentice, 2.ed, 2008. ISBN 978-85-7605-182-4

CHAE, H. J.; IN, M.; KIM, M. Process development for the enzymatic hydrolysis of food protein: effects of pre-treatment and post-treatments on degree of hydrolysis and other product characteristics. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, Korea, v. 3, n. 1, p. 35 - 39, 1998.

CHAPLIN, Martin; **Enzyme Technology: enzyme units**, 2014. Disponível em: <<http://www1.lsbu.ac.uk/water/enztech/units.html>>; Acesso em: 17 nov. 2019.

CHEMAT, F.; Zill-e-Huma; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.18, p. 813 – 835, 2011.

CHENG, F. et al. Determination of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides in chicken leg bone protein hydrolysate with alcalase. **Animal Science Journal**, Malden, v. 80, p.91 - 97, 2009.

CHO, M. J. et al. Hydrophobicity of bitter peptides from soy protein hydrolysates. **J. Agric. Food Chem**, v.52, p. 5895 - 5901, 2004.

COLTELLI, M. et al. State of the Art in the Development and properties of protein-based films and coatings and their applicability to cellulose based products: an extensive review. **Coatings**, v.6, n.1, p.1-59, 2016. DOI 10.3390/coatings6010001

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. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1354354>

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900p.

DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; BRANDELLI, A. Keratinolytic potential of a novel Bacillus sp. P45 isolated from the Amazon basin fish Piaractus mesopotamicus. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.63, p. 358 - 363, 2009. DOI 10.1016/j.ibiod.2008.11.008

DE KANTEREWICZ, R. J.; et al. Water-oil absorption index (WOAI): a simple method for predicting the emulsifying capacity of food proteins. **Journal of Food Science**, Chicago, v.52, n.5, p.1381 - 1383, 1987.

DOGAN, C. E. et al. Detection of cystine and cysteine in wheat flour using a robust LC-MS/MS method. **Journal of cereal science**, v.84, p. 49 - 54, 2018.

EAKSUREE, W. et al. In vitro and in vivo evaluation of protein quality of enzymatic treated feather meals. SpringerPlus, ed. 5, v. 971, p. 1 - 6, 2016. DOI 10.1186/s40064-016-2626-2

EMIDIO, B. N. et al. Proteômica: uma introdução aos métodos e aplicações . **HU Revista**, Juiz de Fora, v. 41, n. 3 e 4, p. 101 - 111, 2015.

ESLAHI, N.; DADASHIAN, F., NEJAD, N. H. An investigation on keratin extraction from wool and feather waste by enzymatic hydrolysis. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 43:7, p. 624 - 648, 2013. DOI: 10.1080/10826068.2013.763826

ESLAHI, N.; HEMMATINEJAD, N.; DADASHIAN, F. From feather waste to valuable nanoparticles, **Particulate Science and Technology**, Philadelphia, v.32, p. 242 - 250, 2014.

FAKHFAKH, N., et al. Total solubilisation of the chicken feathers by fermentation with a keratinolytic bacterium, *Bacillus pumilus* A1, and the production of protein hydrolysate with high antioxidative activity. **Process Biochemistry**, v.46, p.1731 - 1737, 2011.

Food Additive Status List. CFSAN/Office of Food Additive Safety. 2019. U.S, Food and Drug Administration. Disponível em: <<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=182.3798>>; Acesso em: 30 jan. 2020.

FORGÁCS, G. et al. Pretreatment of Chicken Feather Waste for Improved Biogas Production. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 169, p. 2016 - 2028, 2013. DOI 10.1007/s12010-013-0116-3

FRASER, B. R. D.; PARRY, D. A. D. Molecular packing in the feather keratin filament. **Journal of Structural Biology**, v.162, p.1 - 13, 2008.

FUCIÑOS, C. et al. Effectiveness of proteolytic enzymes to remove gluten residues and feasibility of incorporating them into cleaning products for industrial purposes. **Food Research International**, v.120, p. 167 – 177, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.02.037>

GIACOMNI, F. et al. Point of zero charge of protein fibers, an important characteristic for dyeing. **Matéria**, Rio de Janeiro, v.22, n.2, 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/s1517-707620170002.0159>; ISSN 1517-7076

GOBOMA, J. et al. Rapid micro-scale proteolysis of proteins for MALDI-MS peptide mapping using immobilized trypsin. **International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes**, Amsterdam, v. 169/170, p. 153 - 163, 1997.

GRINGER, N. Antioxidative low molecular weight compounds in marinated herring (*Clupea harengus*) salt brine. **Food Chemistry**, v.194, p. 1164 - 1171, 2016.

GBOGOURI, G.A., et al., Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon by-products hydrolysates. **J. Food Sci.**, v.69, p.615 - 622, 2004.

GROOTAERT et al., Clinical aspects of egg bioactive peptide research: a review. *International Journal of Food Science and Technology*, p.1-9, 2019. DOI 10.1111/ijfs.14139

GUPTA, A. et al. Extraction of keratin protein from chicken feather. **Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, New York, v. 6, n. 8, p.732 - 737, 2012.

GUPTA, A; SHARMA, S. Sustainable management of keratin waste biomass: applications and future perspectives. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 59, p.1 - 14, 2016.

GUPTA, R; RAMNANI, P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, p.21 - 33, 2006. DOI 10.1007/s00253-005-0239-8

HABERT, A. C.; BORGES, C. P.; NOBREGA, R. Processos de separação com membranas. Rio de Janeiro: E-papers, 2006. 180p.: il.; (Escola piloto em engenharia química; 3) ISBN 85-7650-085-X

HAN, X; ASLANIAN, A.; YATES, J. R. Mass spectrometry for proteomics. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 12, p.483 - 490, 2008. DOI10.1016/j.cbpa.2008.07.024

HANDBOOK OF CHEMISTRY AND PHYSICS, CRC press, 97 ed., 2017. ISBN-13: 978-1-4987-5429-3 (eBook - PDF).

HOLKAR, C. R., et al. Acoustic cavitation assisted alkaline hydrolysis of wool based keratins to produce organic amendment fertilizers. **ACS Sustain. Chem. Eng.**, v. 4, p. 2789 - 2796, 2016.

HOLKAR, C. R. et al. Valorization of keratin based waste. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 115, p. 85 - 98, 2018.

ISMAIL, N. I. et al. Production of cysteine: Approaches, challenges and potential solution. **International Journal of Biotechnology for Wellness Industries**, v. 3, p. 95 - 101, 2014.

JAMBRAK, A. R. et al. Effect of ultrasound treatment on particle size and molecular weight of whey proteins. **Journal of Food Engineering**, v. 121, p.15 – 23, 2014.

JAOUADI, B. et al. Enhancement of the thermostability and the catalytic efficiency of *Bacillus pumilus* CBS protease by site-directed mutagenesis. **Biochimie**, v. 92, p. 360 – 369, 2010.

JE, J.Y.; PARK, P.J.; KIM, S.K. Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. *Food Res. Int.*, v. 38, p. 45 - 50, 2005.

JOVANOVIĆ, J. R. et al. Ultrasound pretreatment as an useful tool to enhance egg white protein hydrolysis: kinetics, reaction model, and thermodynamics. **Journal of Food Science**, Medford, v. 81, n. 11, p. 2664 - 2675, 2016.

KSHETRI, P. et al. Transforming Chicken Feather Waste into Feather Protein Hydrolysate Using a Newly Isolated Multifaceted Keratinolytic Bacterium *Chryseobacterium sediminis* RCM-SSR-7. **Waste Biomass Valor**, v. 10, p. 1–11, 2019. DOI 10.1007/s12649-017-0037-4

KOTHARI, D.; RANI, A.; GOYAL, A. **19 – Keratinases. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**. Production, Isolation and Purification of Industrial Products. p.447 - 469, 2017. Disponivel em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63662-1.00019-1>>; Acesso em: 17 nov 2019.

KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General properties. **The Journal of General Physiology**, v.30, p. 291 - 310, 1947.

KHOSA, M.A.; ULLAH, A. Chemical modification, characterization, and application of chicken feathers as novel biosorbents. **RSC Adv.**, v. 3, p. 20800 - 20810, 2013.

LANGE, L.; HUANG, Y.; BUSK, P. K. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 100, p. 2083 - 2096, 2016. DOI 10.1007/s00253-015-7262-1

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

LEMES, A. C. et al. A review of the latest advances in encrypted bioactive peptides from protein-richwaste, **International Journal of Molecular Sciences**, v.17, p. 2 - 24, 2016a.

LEMES, A. C. et al. Simultaneous production of proteases and antioxidant compounds from agro-industrial by-products. **Bioresource Technology**, New York, v. 222, p. 210 - 216, 2016b.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-276, 1951.

MEDZIHRADSKY, K. F.; Adams, G. W. ; Burlingame, A. L. Peptide sequence determination by matrix-assisted laser desorption ionization employing a tandem double focusing magnetic-orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometer, **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, Santa Fe, v.7, p. 1 - 10, 1996.

MEDZIHRADSKY, K. F. et al. The Characteristics of peptide collision-induced dissociation using a high-performance MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer. **Analytical Chemistry**, Illinois, v. 72, p. 552 - 558, 2000.

MOKREJS, P. et al. Processing poultry feathers into keratin hydrolysate through alkaline-enzymatic hydrolysis. **Waste Manage Res**, v. 29, p. 260 - 267, 2011.

MOORE, G. R.P.; MARTELLI, S. M., GANDOLFO, C. A.; PIRES, A. T.N.; LAURINDO, J. B. Queratina de penas de frango: extração, caracterização e obtenção de filmes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26(2), p.421 - 427, 2006.

MOHANTY, A. K.; MISRA, M.; DRZAL, L.T. Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites, CRC Press, 2005. ISBN 0-8493-1741-X.

MORR, C. V.; GERMAN, B.; KINSELLA, J.E.; REGENSTEIN, J.P.; BUREN, V.; KILARA, A.; LEWIS, B.A.; MANGINO, M.E. Collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**, Chicago, v.50, n.6, p. 1715 -1718, 1985.

NOVOZYMES A/S. Proteases for biocatalysis for smarter chemical synthesis. Krogshoejvej Bagsvaerd Denmark; [pharmaceuticals@novozymes.com](mailto:pharmaceuticals@novozymes.com), 2016. Disponível em: <[https://www.novozymes.com/-/media/Project/Novozymes/Website/website/documentlibrary/Advance-your-business/Pharma/Product\\_range\\_Pharma.pdf](https://www.novozymes.com/-/media/Project/Novozymes/Website/website/documentlibrary/Advance-your-business/Pharma/Product_range_Pharma.pdf)>; Acesso em: 19 setembro 2019.

NYO, M. K.; NGUYEN, · L. T. Value-Addition of Defatted Peanut Cake by Proteolysis: Effects of Proteases and Degree of Hydrolysis on Functional Properties and Antioxidant Capacity of Peptides. **Waste and Biomass Valorization**, v.10, p.1251 -1259, 2019. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-0146>

ONIFADE, A. A.; AL-SANE, N. A.; AI-MUSALLAM, A. A.; AL-ZARBAN, S. A review: potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. **Bioresource Technology**, New York, v. 66, p.1 - 11, 1998.

O'DONNELL, C.P. et al., Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance. **Trends in Food Science & Technology**. v. 21 (7), p. 358 - 367, 2010.

ORNITHOS ESCOLA. Design by Brtem. Disponível em: <<http://www.ornithos.com.br/escola/guia-do-observador/caracteristicas-das-aves/>>, Acesso em: 03 março 2019.

OZCAN, T.; KURDAL, E. The effects of using a starter culture, lipase, and protease enzymes on ripening of Mihalic cheese. **Int J Dairy Technol.** v.65, p. 585 - 593, 2012.

PAGÁN, J. et al. Enzymatic hydrolysis kinetics and nitrogen recovery in the protein hydrolysate production from pig bones. **Journal of Food Engineering.** v.119, p. 655 - 659, 2013.

PAPADOPOULOS, M. C. et al. Effects of processing time and moisture content on amino acids composition and nitrogen characteristics of feather meal. **Animal Feed Sci Technol**, v.14, p.279 - 290, 1986.

PETERS, R. J. B. Characterization of titanium dioxide nanoparticles in food products: analytical methods to define nanoparticles. *J. Agric. Food Chem.*, v. 62, p. 6285 – 6293, 2014. DOI 10.1021/jf5011885|

POOLE, A. J.; CHURCH, J. S. The effects of physical and chemical treatments on Na<sub>2</sub>S produced feather keratin films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.73, p. 99 - 108, 2015.

PRALEA, D. et al. Functional properties of sodium caseinate hydrolysates as affected by the extent of chymotrypsinolysis. **Journal of Agroalimentary Processes and Technologies**, v.17, p.308 - 314, 2011.

RAMNANI, P; GUPTA, R. Keratinases vis-a-vis conventional proteases and feather degradation. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v.23, p.1537 - 1540, 2007. DOI 10.1007/s11274-007-9398-3

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

REDDY, N.; YANG, Y.Q. Structure and properties of chicken feathers barbs as natural protein fibers. **J Polym Environ**, v.15, p. 81 - 87, 2007.

ROCHA, G. F. et al. Potential antioxidant peptides produced from whey hydrolysis with an immobilized aspartic protease from *Salpichroa organifolia* fruits. **Food Chemistry.** v. 237, p.350-355, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.112>.

RODRIGUES, M. I.; LEMMA, A. F. **Experimental Design and Process Optimization**. 1. ed. Florida: CRC Press, 2015. 336 p. ISBN 13-978-1-4822-9956-4

ROMAN, J. A.; SGARBIERI, V. C. Efeito da hidrólise enzimática sobre propriedades funcionais de caseína bovina coagulada pela ação da quimosina. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.25, n.3, p.468 - 474, 2005.

RUTHERFURD, S. M. Methodology for determining degree of hydrolysis of proteins in hydrolysates: a review. **Journal of AOAC international**, Rockville, v.93, n. 5, p. 1515 - 1522, 2010.

RYAN, J. T. et al. Bioactive peptides from muscle sources: meat and fish. **Nutrients**, v. 3, p. 765 - 791, 2011. DOI:10.3390/nu3090765

SARKER, U.; OBA, S. Antioxidant constituents of three selected red and green color Amaranthus leafy vegetable. *Nature Scientific reports*, v.9, p. 1-11, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52033-8>

SARMADI, B.H.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: A review. **Peptides**, v. 31, p.1949 - 1956, 2010.

SKOOG, D. A. ; HOLLER, F. J. ; CROUCH, S. R. **Principles of instrumental analysis**. 5. ed. Santa Fe Philadelphia: Saunders College, 849p., 1998. ISBN-13: 978-607-481-390-6; ISBN-10: 607-481-390-6.

SHARMA, S. et al. Clean An efficient conversion of waste feather keratin into ecofriendly bioplastic film. **Technologies and Environmental Policy**, v.20, p.2157 - 2167, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10098-018-1498-2>.

SHARMA, S. et al. Characterization of keratin microparticles from feather biomass with potent antioxidant and anticancer activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.104, p.189 - 196, 2017.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Bioactive peptides. **Journal of AOAC international**, Rockville, v.91, n.4, p.914 - 931, 2008.

SHAW, Duncan J. **Introduction to colloid and surface chemistry**. 4. ed. Oxford: Butterworth Heinemann, 1992. 306 p. ISBN 0750611820

SORIA, A. C.; VILLAMIEL, M. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v.21, p. 323 - 331, 2010.

SPACKMAN, D.H.; STEIN, W.H.; MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. **Analytical Chemistry**, v. 30, p. 1.190 - 1.206, 1958.

SUN, S. et al. Antioxidant and anti-fatigue activities of egg white peptides prepared by pepsin digestion. **J Sci Food Agric**, v.94, p. 3195 - 3200, 2014.

TESFAYE, T. et al., Valorisation of chicken feathers: characterisation of physical properties and morphological structure. **Journal of Cleaner Production**, v.149, p. 349 - 365, 2017.

TIWARY, E.; GUPTA, R. Rapid Conversion of Chicken Feather to Feather Meal Using Dimeric Keratinase from *Bacillus licheniformis* ER-15. **J Bioprocess Biotech**, v.2, p.1-5, 4. ed., 2012. DOI: 10.4172/2155-9821.1000123

TUKEY, J.W. The problem of multiple comparisons. Mimeographs Princeton. University, Princeton, N.J., 1953.

ULUKO, H. et al. Effects of microwave and ultrasound pretreatments on enzymolysis of milk protein concentrate with different enzymes. **International Journal of Food Science and Technology**, Malden, v. 48 p. 2250 - 2257, 2013a.

ULUKO, H. et al. Response surface optimization of angiotensin converting enzyme inhibition of milk protein concentrate hydrolysates *in vitro* after ultrasound pretreatment. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Berlin, v. 20, p. 133 - 139, 2013b.

ULUKO, H. et al. Effect of power ultrasound pretreatment on peptidic profiles and angiotensin converting enzyme inhibition of milk protein concentrate hydrolysates. **J Sci Food Agric** v.94, p. 2420 - 2428, 2014.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). Foreign Agricultural Service. Production, Supply and Distribution. Disponivel em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/advQuery>. Acesso: jun 2019.

VORM, O; ROEPSTORFF, P.; MANN, M. Improved resolution and very high sensitivity in MALDI TOF of matrix surfaces made by fast evaporation. **Analytical Chemistry**, Illinois, v. 66, p.3281 - 3287, 1994.

WANG, B. et al. Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration. **Progress in Materials Science**, v. 76, p.229 - 318, 2016.

WANG, B. et al. Isolation and Characterization of Collagen and Antioxidant Collagen Peptides from Scales of Croceine Croaker (*Pseudosciaena crocea*). **Mar. Drugs**, 11, 4641-4661, 2013.

WANG, Y. X.; CAO, X. J. Extracting keratin from chicken feathers by using a hydrophobic ionic liquid. **Process Biochemistry**, v.47, p. 896 - 899, 2012.

WANG, X.; PARSONS, C. M. Effect of processing systems on protein quality of feather meal and hair meals. **Poultry Sci**, v. 76, p.491 - 496, 1997.

WEISS, J., KRISTBERGSSON, K., KJARTANSSON, G.T. Engineering food ingredients with high-intensity ultrasound. In: Feng, H., Barbosa-Canovas, G.V., Weiss, J. (Eds.), *Ultrasound technologies for food and bioprocessing*. **Springer Science+Business Media**, New York, p. 239 - 285, 2011.

WU, T.Y. et al. Theory and fundamentals of ultrasound. **Advances in Ultrasound Technology for Environmental Remediation**, Springer Netherlands, Dordrecht, p. 5 - 12, 2013. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-5533-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-94-007-5533-8_2)

YACOUBOU, J. Offers Amy's kitchen vegan burger on a vegan bun. **Vegetarian Journal**, v. 30, ed. 2, p. 9, 2011. Disponível em: <<https://link-gale.ez15.periodicos.capes.gov.br/apps/doc/A255085802/AONE?u=capes&sid=AONE&xid=b581cf89>>; Acesso em: 31 jan. 2020.

ZHOU, C. et al. Heat and/or ultrasound pretreatments motivated enzymolysis of corn gluten meal: Hydrolysis kinetics and protein structure. **LWT - Food Science and Technology**, v. 77, p.488 - 496, 2017.

ZOU, Y. et al. Enzymolysis kinetics, thermodynamics and model of porcine cerebral protein with single-frequency countercurrent and pulsed ultrasound-assisted processing. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.28, p.294 - 301, 2016.

ZOU, Y. et al. Effects of ultrasound assisted extraction on the physiochemical, structural and functional characteristics of duck liver protein isolate. **Process Biochemistry**, v. 52, p. 174 - 182, 2017.