

POTENCIAL DE PROTEASES NÃO-COMERCIAIS NA OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS ANTIOXIDANTES A PARTIR DE SUBPRODUTOS DA CADEIA PRODUTIVA DA CARNE

AMANDA M. AZAMBUJA^{1,2*}, GABRIELA P. MORAES³, DANIEL J. DAROIT^{2,4,§}

1 Introdução

A indústria da carne gera diversos subprodutos, como peles, sangue, ossos e vísceras. Subprodutos do abate e processamento para a obtenção de carne suína representam ~44% do peso vivo do animal. O descarte incorreto destes subprodutos acarreta problemas ambientais, e elevados custos estão associados ao correto manejo. Assim, a conversão destas biomassas em produtos úteis vem sendo abordada no escopo da economia circular (Borrajó et al., 2019).

Subprodutos animais, ricos em proteínas, são recursos abundantes para a produção de hidrolisados proteicos. Interesse reside nas atividades biológicas dos hidrolisados, atribuídas aos peptídeos liberados durante a hidrólise. Hidrolisados bioativos são produtos valorizados, e sua obtenção a partir de subprodutos apresenta-se como uma oportunidade para otimizar as performances econômica e ambiental da indústria da carne (Lafarga; Álvarez; Hayes, 2017).

A produção de hidrolisados proteicos é comumente realizada via catálise enzimática, usando para tanto proteases obtidas de animais, vegetais e microrganismos. Considerando a ampla diversidade microbiana, esforços são dedicados à prospecção de proteases bacterianas e fúngicas adequadas à obtenção de hidrolisados bioativos (Brandelli; Daroit, 2024).

2 Objetivos

Obter hidrolisados antioxidantes a partir de subprodutos de origem animal por meio de catálise enzimática, utilizando uma protease bruta produzida por *Bacillus* sp. CL18.

3 Metodologia

A produção de proteases por *Bacillus* sp. CL18 ocorreu em meio mineral (K₂HPO₄,

1 Graduanda do Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária, Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Campus Cerro Largo. Contato: amazambuja@hotmail.com.

2 Grupo de Pesquisa: Biociências.

3 Mestranda, PPG em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis, UFFS, Campus Cerro Largo.

4 Doutor em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. UFFS, Campus Cerro Largo. **Orientador.**

§ Contato: daniel.daroit@uffs.edu.br

0,3 g/L; KH_2PO_4 , 0,4 g/L; NaCl, 0,5 g/L) contendo escamas de peixe (30 g/L) e penas de frango (5 g/L). Após inoculação e incubação (30 °C, 125 rpm, 4 dias), os meios foram centrifugados ($10.000 \times g$; 10 min) e os sobrenadantes usados como protease bruta.

Os subprodutos de origem animal (fígado e baço suínos), obtidos de abatedouro da região, foram processados em liquidificador (5 min) e tratados termicamente (90 °C, 20 min) para inativar enzimas endógenas. Estes materiais foram submetidos à hidrólise enzimática.

Para as hidrólises, cada subproduto (20 g/L) foi adicionado de tampão Tris-HCl (100 mM, pH 8,0; 5 mM Ca^{2+}). Após pré-incubação (52,5 °C; 20 min), as reações foram iniciadas pela adição da protease bruta (4% v/v; 700 U/mL). As incubações ocorreram a 52,5 °C por até 6 h em banho-maria com agitação. Frascos (triplicatas) foram retirados em tempos específicos de incubação (t; 0, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 360 min), e as reações finalizadas por fervura (20 min). Após centrifugação ($10.000 \times g$, 30 min), os sobrenadantes (denominados hidrolisados) foram avaliados quanto ao teor de proteínas solúveis e atividade antioxidante.

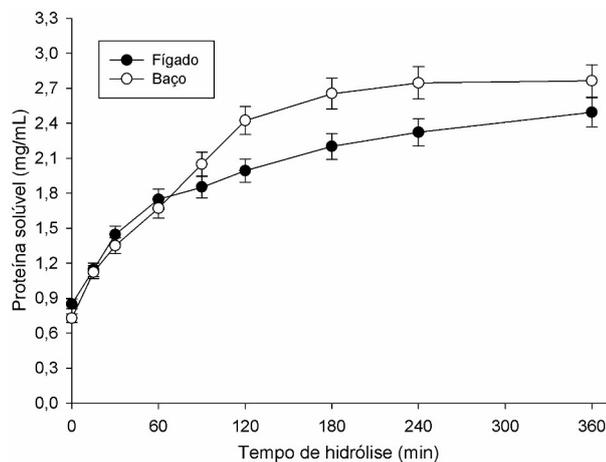
A concentração de proteínas solúveis nos hidrolisados (mg/mL) foi determinada pelo método Folin-fenol. Quanto às atividades antioxidantes, foram mensuradas, (a) a captura do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH, %), pela absorbância (Abs) a 517 nm; (b) a captura do radical 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS, %), pela Abs a 734 nm (%); (c) a quelação de Fe^{2+} (%), pelo método da ferrozina (Abs a 562 nm); e (d) o poder redutor, pelo método do ferricianeto de potássio (Abs a 700 nm).

4 Resultados e Discussão

O tratamento de fígado e baço com a protease bruta resultou em aumento do teor de proteínas solúveis (Fig. 1), indicando a capacidade da preparação enzimática em hidrolisar proteínas constituintes de ambos os subprodutos. A concentração de proteínas solúveis de fígado foi incrementada de 0,85 mg/mL (t0) para 1,44, 1,99 e 2,49 mg/mL em t30, t120 e t360, respectivamente. A enzimólise de baço suíno resultou em aumento de 0,73 mg/mL (t0) para 1,35, 2,42 e 2,76 mg/mL em t30, t120 e t180, respectivamente (Fig. 1).

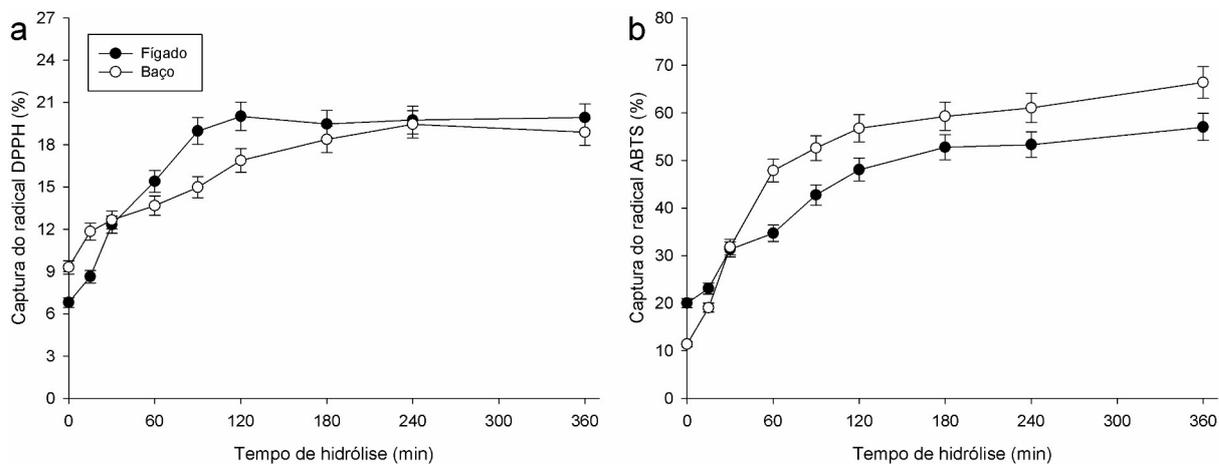
As taxas de liberação de proteínas solúveis foram mais rápidas até t60 (fígado) e t120 (baço), decrescendo no decorrer do tempo (Fig. 1), o que pode estar associado à diminuição do número de ligações peptídicas acessíveis à hidrólise, competição entre peptídeos liberados e proteínas intactas, e a desnaturação parcial da protease bruta (Brandelli; Daroit, 2024).

Figura 1. Concentração de proteínas solúveis (mg/mL) mensurada após o tratamento de fígado (●) e baço (○) suínos pela protease bruta de *Bacillus* sp. CL18.



A produção de hidrolisados antioxidantes a partir de subprodutos da indústria da carne vem sendo investigada devido ao potencial destes bioprodutos em se opor aos efeitos negativos das reações de oxidação sobre a saúde humana e a qualidade dos alimentos (Borrajo et al., 2019). Assim, o potencial antioxidante dos hidrolisados obtidos foi averiguado por meio de quatro ensaios *in vitro*. Observou-se que a hidrólise elevou a capacidade de eliminação dos radicais DPPH (Fig. 2a) e ABTS (Fig. 2b).

Figura 2. Captura dos radicais DPPH (a) e ABTS (b) por hidrolisados de fígado (●) e baço (○) suínos obtidos com a protease bruta de *Bacillus* sp. CL18.



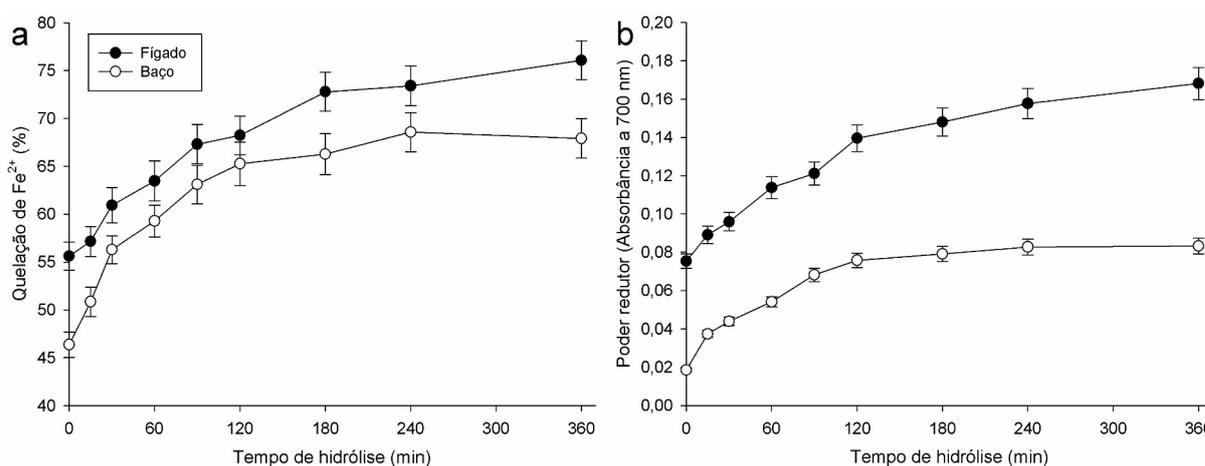
As atividades superiores nos hidrolisados, comparadas aos substratos iniciais (t_0), indicam a capacidade dos peptídeos liberados em transferir elétrons e assim neutralizar os

radicais (Zhu et al., 2022). Especificamente, a captura do radical DPPH em hidrolisados de fígado suíno atingiu 19,4-20,0% em t120-t360, em comparação a t0 (6,8%). Para hidrolisados de baço, o valor em t0 (9,3%) foi incrementado para 18,4-19,4% em t180-t360 (Fig. 2a).

Quanto ao ensaio ABTS (Fig. 2b), a captura inicial (t0) deste radical foi de 20,0% (fígado) e 11,4% (baço). No decorrer da hidrólise de fígado, a captura foi elevada para 34,7%, 48,1% e 52,8-57,0% em t60, t120 e t180-t360, respectivamente. Nos hidrolisados de baço suíno, as capturas atingiram 47,9% (t60), 56,8% (t120) e 59,3-66,4% em t180-t360 (Fig. 2b).

A hidrólise exerceu efeito positivo sobre a quelação de íons ferrosos (Fig. 3a). Verificou-se que a capacidade quelante de fígado suíno (55,6%; t0) foi elevada para 63,5% (t60) e 72,8% (t180). Para os hidrolisados de baço, quelações de 59,3% e 66,3% foram detectadas em t60 e t180, em comparação aos 46,4% mensurados em t0 (Fig. 2b). Íons ferrosos catalisam a geração de radicais livres, que afetam negativamente a saúde humana e as propriedades organolépticas de alimentos. Assim, ao indisponibilizar Fe^{2+} , a quelação é mecanismo relevante à capacidade antioxidante de hidrolisados proteicos (Zhu et al., 2022).

Figura 3. Quelação de íons ferrosos (a) e poder redutor (b) exibido por hidrolisados de fígado (●) e baço (○) suínos obtidos com a protease bruta de *Bacillus sp.* CL18.



O poder redutor foi superior nos hidrolisados, em comparação ao fígado e baço não hidrolisados (Fig. 3b), sugerindo a capacidade dos peptídeos liberados em doar elétrons, o que pode ser refletido na habilidade de reduzir intermediários oxidados da peroxidação lipídica.

Fígados de animais de açougue são recursos reconhecidos para a produção de hidrolisados bioativos (Zou et al., 2021). Baços suínos são menos explorados; entretanto, sua

hidrólise com pepsina e tripsina incrementou a capacidade antirradical (Liu et al., 2023). Hidrolisados proteicos são usualmente produzidos com proteases comerciais. No entanto, os resultados obtidos sugerem a aplicabilidade de uma protease alternativa, reforçando o caráter promissor de enzimas não-comerciais para tal propósito (Brandelli; Daroit, 2024).

5 Conclusão

A protease de *Bacillus* sp. CL18 hidrolisou subprodutos da indústria da carne. Os hidrolisados de fígado e baço suínos exibiram potencial antioxidante superior àquele dos substratos iniciais, associado à doação de elétrons e quelação de Fe²⁺. As atividades mais elevadas foram detectadas após 2-3 h de hidrólise. Aparentemente, a obtenção de hidrolisados antioxidantes de baço suíno com uma protease não-comercial é descrita pela primeira vez.

Referências Bibliográficas

- BORRAJO, P. et al. Antioxidant and antimicrobial activity of peptides extracted from meat by-products: a review. **Food Analytical Methods**, v. 12, p. 2401-2415, 2019.
- BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J. Unconventional microbial proteases as promising tools for the production of bioactive protein hydrolysates. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 64, p. 4714-4745, 2024.
- LAFARGA, T.; ÁLVAREZ, C.; HAYES, M. Bioactive peptides derived from bovine and porcine co-products: A review. **Journal of Food Biochemistry**, v. 41, Article e12418, 2017.
- LIU, C. et al. Comprehensive assessment of peptide derived from pig spleen: Preparation, bioactivity and structure-activity relationships. **Food Bioscience**, v. 56, Article 103361, 2023.
- ZHU, Y. et al. Food protein-derived antioxidant peptides: molecular mechanism, stability and bioavailability. **Biomolecules**, v. 12, Article 1622, 2022.
- ZOU, Y. et al. Values-added utilization of protein and hydrolysates from animal processing by-product livers: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 110, p. 432-442, 2021.

Palavras-chave: protease; hidrólise enzimática; subprodutos agroindustriais; bioatividades.

Nº de Registro no sistema Prisma: PES 2023-0083

Financiamento

UFFS – Bolsa de iniciação científica (PES 2023-0083) e Auxílio financeiro (PES 2023-0080).