

WULLISSIS VIANA GONÇALVES DE LIMA

**DESENVOLVIMENTO DE UM PROCESSO ENZIMÁTICO
PARA A OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS DE PENAS
UTILIZANDO PEPTIDASES INESPECÍFICAS**



02

**Monografia apresentada ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade
Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito
para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas: Microbiologia e Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO 2024**

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Geral, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Ana Maria Mazotto de Almeida.

FICHA CATALOGRÁFICA

V964d Viana, Wullissis
Desenvolvimento de um processo enzimático para a
obtenção de hidrolisados de penas utilizando
peptidases inespecíficas / Wullissis Viana. -- Rio
de Janeiro, 2023.
48 f.

Orientadora: Ana Maria Mazzoto de Almeida .
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2023.

1. Queratina. 2. Indústria Avícola. 3. Proteases
. 4. Agentes redutores . 5. Penas. I. Maria Mazzoto
de Almeida , Ana , orient. II. Título.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO RCS DE
 TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO EM CIÊNCIAS
 BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA**

ALUNO(A): **Wullissis Viana Gonçalves**

DRE: **119044575**

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Mateus Godoy (Presidente)
 Prof. Dirlei Nico
 Prof. Gabriella Mendes
 Prof. Fernanda de Ávila Abreu (Suplente)

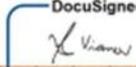
Título da Monografia: **“Desenvolvimento de um processo enzimático para obtenção de hidrolisados de penas utilizando peptidases inespecíficas”**

Local: **IMPG / CCS / UFRJ**

Data e hora de início: **26 de fevereiro de 2024 às 09:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 8,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 26 de fevereiro de 2024.

NOTA:	Banca Examinadora:	<p style="text-align: center;">Documento assinado digitalmente  MATEUS GOMES DE GODOY Data: 26/02/2024 10:54:21-0300 Verifique em https://validar.ibi.gov.br</p> <p style="text-align: center;">Prof. Mateus Godoy (Presidente)</p>
<u>8,0</u>		<p style="text-align: center;">Documento assinado digitalmente  DIRLEI NICO Data: 26/02/2024 12:37:37-0300 Verifique em https://validar.ibi.gov.br</p>
<u>8,0</u>		<p style="text-align: center;">Documento assinado digitalmente  GABRIELLA DA SILVA MENDES Data: 28/02/2024 11:03:39-0300 Verifique em https://validar.ibi.gov.br</p>
		<p style="text-align: center;">Prof. Fernanda de Ávila Abreu (Suplente)</p> <p style="text-align: center;">DocuSigned by:  80D6C80214D5446 Wullissis Viana Gonçalves</p>
Aluno(a):		<p style="text-align: center;">Documento assinado digitalmente  ANA MARIA MAZOTTO DE ALMEIDA Data: 28/02/2024 13:25:13-0300 Verifique em https://validar.ibi.gov.br</p>
Orientador(a) (e coorientador):		<p style="text-align: center;">Documento assinado digitalmente  MARINELLA SILVA LAPORT Data: 12/03/2024 08:30:35-0300 Verifique em https://validar.ibi.gov.br</p>
Coordenadora de TCC:		

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha gratidão a todas as pessoas e instituições que contribuíram de maneira significativa para a realização desta pesquisa. Sem o apoio delas, essa conquista não teria sido possível. Primeiramente, quero agradecer a minha orientadora Ana Maria Mazotto pela oportunidade e sua orientação valiosa e paciente foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Gostaria de agradecer principalmente a minha mãe, meu pai e minha irmã que vivenciaram cada luta desde o primeiro passo. Agradeço também aos meus amigos, pelo incentivo, apoio emocional e compreensão ao longo de toda a jornada. Vocês foram minha base durante os momentos desafiadores. Aos colegas de turma e professores que compartilharam conhecimentos e colaboraram ao longo deste percurso acadêmico, agradeço por todas as discussões enriquecedoras e aprendizados compartilhados.

RESUMO

WULLISSIS VIANA GONÇALVES DE LIMA

DESENVOLVIMENTO DE UM PROCESSO ENZIMÁTICO PARA OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS DE PENAS UTILIZANDO PEPTIDASES INESPECÍFICAS

Orientadora: Ana Maria Mazotto de Almeida

Resumo do Trabalho de Conclusão de Curso apresentado no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

A indústria avícola desencadeia a produção maciça de penas, gerando um resíduo abundante e desafiador para a gestão sustentável. Este trabalho explora a viabilidade de reaproveitar essas penas por meio do desenvolvimento de um processo enzimático inovador. A queratina, uma proteína que compões 90% da pena, apresenta propriedades que podem ser exploradas para a obtenção de produtos com valor agregado. A queratina é caracterizada por sua insolubilidade, estrutura resistente e alto teor de ligações dissulfeto, por isso é necessário métodos que tornem essa reserva de proteínas disponível. Atualmente métodos microbianos e enzimáticos tem se tornado promissores, sendo alvo de vários estudos. O estudo conduzido neste trabalho focou na hidrólise de penas picadas utilizando duas enzimas comerciais com ou sem a presença de um agente redutor. Os hidrolisados resultantes dessa reação podem apresentar um maior valor agregado e diversas aplicações na biotecnologia. Dos agentes redutores que mais geraram peptídeos, a presença de sulfito de sódio a 2% com a Alcalase apresentou a maior concentração de peptídeos (2,55 mg/ml), enquanto não foi notável níveis relevantes de peptídeos solúveis na reação com a Flavourzyme. A adição de cisteína não se mostrou muito relevante na

geração de peptídeos solúveis, apresentando o melhor resultado de 0,5 mg/ml na maior concentração do agente redutor (2%) com a enzima Alcalase (P4860). A presença de bissulfito de sódio na reação com a Flavourzyme produziu valores descartáveis de peptídeos solúveis, entretanto, apresentou uma melhora considerável na degradação com a Alcalase, chegando a 1,57 mg/ml de proteínas solúveis na maior concentração do agente redutor testado. Os resultados sugerem que enzimas proteolíticas inespecíficas podem ser empregadas na degradação de resíduos queratinosos quando na presença de um agente redutor adequado.

Palavras-chave: indústria avícola, penas, queratina, hidrólise enzimática, agentes redutores.

ABSTRACT**WULLISSIS VIANA GONÇALVES DE LIMA****DEVELOPMENT OF AN ENZYMATIC PROCESS FOR OBTAINING
FEATHER HYDROLYSATES USING NON-SPECIFIC PEPTIDASES****Supervisor: Ana Maria Mazotto de Almeida**

Abstract do Trabalho de Conclusão de Curso apresentado no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

The poultry industry triggers massive feather production, generating abundant and challenging waste for sustainable management. This work explores the feasibility of reutilizing these feathers through the development of an innovative enzymatic process. Keratin, the primary component of feathers, possesses properties that can be harnessed for obtaining value-added products. Keratin is characterized by its insolubility, resilient structure, and rich disulfide bond content, which requires methods to render this protein reservoir accessible. Currently, microbial and enzymatic methods have emerged as promising avenues, subject to numerous studies. This study focused on the hydrolysis of chopped feathers using two commercial enzymes with or without the presence of a reducing agent. The resulting hydrolysates from this reaction can exhibit higher added value and various applications in biotechnology. Among the reducing agents, the addition of sodium sulfite 2% concentration with Alcalase yielded a higher result of 2.55 mg/ml of soluble peptides, while no notable levels of soluble proteins were observed in the reaction with Flavourzyme. The inclusion of cysteine did not exhibit significant relevance in generating soluble peptides, producing the best outcome of 0.5 mg/ml at the highest concentration of the reduction agent (2%) with the Alcalase enzyme. On the other hand, sodium bisulfite in the reaction with the Flavourzyme enzyme produced negligible

peptides but improved the Alcalase enzyme reaction, reaching 1.57 mg/ml at the highest concentration of sodium bisulfite. The results suggest that nonspecific proteolytic enzymes can be used in the degradation of keratinous residues when in the presence of a suitable reducing agent.

Keywords: poultry industry, feathers, keratin, enzymatic hydrolysis, reducing agents.

RESUMO PARA PESSOAS LEIGAS

WULLISSIS VIANA GONÇALVES DE LIMA

DESENVOLVIMENTO DE UM PROCESSO ENZIMÁTICO PARA OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS DE PENAS UTILIZANDO PEPTIDASES INESPECÍFICAS

Orientadora: Ana Maria Mazotto de Almeida

Resumo para pessoas leigas do Trabalho de Conclusão de Curso apresentado no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

A criação de aves para alimentos produz muitas penas como sobra, o que é um desafio para cuidarmos do ambiente de forma sustentável. Este estudo explora uma ideia criativa: usar um processo especial para reaproveitar essas penas em algo útil. As penas são feitas principalmente de uma proteína chamada queratina, que tem propriedades nutricionais e químicas interessantes. No entanto, a pena é um material muito resistente, o que dificulta o seu uso. Neste estudo, penas picadas foram tratadas com enzimas e produtos químicos chamados de agentes redutores para obtenção de produtos resultantes dessa degradação, esses produtos são vários fragmentos menores da queratina das penas e podem ser aplicados em diversos setores como alimentos, cosméticos e biomateriais. Nosso estudo aponta que as queratinas podem ser enzimaticamente convertidas a hidrolisados utilizando enzimas não queratinolíticas auxiliadas por certos agentes redutores.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura das penas de aves. Adaptado de https://askabiologist.asu.edu/explore/feather-biology	2
Figura 2 - Estrutura da pena e estrutura secundária da β -queratina. (a) A estrutura das penas apontando suas partes principais: bárbulas/farpas, barbas, raque; (b) Aminoácidos conservados das bárbulas/farpas (número de acesso NCBI: NP_001095201.2), barbas (NP_001264699.1) e raque de penas (NP_001264688.1) com as fitas β em cada sequência indicada em vermelho; (c) A estrutura central monomérica da β -queratina nas penas baseada na composição de aminoácidos. (d) A estrutura monomérica central da β -queratina, onde as quatro fitas são usualmente antiparalelas; (e) Estrutura dimérica (β -sanduíche) de β -queratina; (f) A estrutura básica de repetição dos filamentos β , com os quatro dímeros girados em aprox. 45° para formar uma estrutura helicoidal, com o quinto dímero na parte inferior assumindo uma posição sanduíche invertida em relação ao primeiro dímero (Adaptado de Qiu et al., 2020).	4
Figura 3 – Classificação das peptidases de acordo com a local de clivagem e aminoácido ou molécula presente no sítio ativo (fonte: autoral).	6
Figura 4 - Aplicação biotecnológica das queratinases. Adaptado de Vidmar e Vodovnik, 2018.	11
Figura 5 - Concentração de proteínas dos sobrenadantes gerados após a degradação de penas usando a enzima 6110 na presença de tioglicolato em quatro concentrações diferentes. TR= Tubo de reação e B= Controle com adição de TCA antes da reação. ...	23
Figura 6 - Concentração de proteínas dos sobrenadantes gerados durante a degradação de penas usando a enzima 6110 na presença de cisteína em diferentes concentrações. TR = Tubo de reação e B = Controle com adição de TCA antes da reação.	23
Figura 7 - Concentração de proteínas dos sobrenadantes gerados durante a degradação de penas usando a enzima P6110 na presença de bissulfito em quatro concentrações diferentes. TR = Tubo de reação e B = Controle com adição de TCA antes da reação. ...	24
Figura 8 - Concentração de proteínas dos sobrenadantes gerados durante a degradação de penas usando a enzima 6110 na presença de DTT em 4 concentrações diferentes. TR = Tubo de reação e B = Controle com adição de TCA antes da reação.	24

- Figura 9** - Concentração de proteínas dos sobrenadantes gerados durante a degradação de penas usando a enzima P4860 com a presença de tioglicolato de sódio em 4 concentrações diferentes. TR = Tubo de reação e B = Controle com adição de TCA antes da reação. 25
- Figura 10** - Concentração de proteínas dos sobrenadantes gerados durante a degradação de penas usando a enzima P4860 na presença de cisteína em 4 concentrações diferentes. TR = Tubo de reação e B = Controle com adição de TCA antes da reação. 26
- Figura 11** - Concentração de proteínas dos sobrenadantes gerados durante a degradação de penas usando a enzima P4860 na presença de bissulfito de sódio em 4 concentrações diferentes. TR = Tubo de reação e B = Controle com adição de TCA antes da reação. 26
- Figura 12** - Concentração de proteínas dos sobrenadantes gerados durante a degradação de penas usando a enzima P4860 na presença de cisteína em 4 concentrações diferentes. TR = Tubo de reação e B = Controle com adição de TCA antes da reação. 27
- Figura 13** - Concentração de proteínas dos sobrenadantes gerados durante a degradação de penas usando a enzima P4860 na presença de DTT em 4 concentrações diferentes. TR = Tubo de reação e B = Controle com adição de TCA antes da reação. 27

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Produção avícola.....	1
1.2 Penas de frango.....	2
1.2.1 Queratina.....	3
1.3 Peptidases	5
1.4 Mecanismo de hidrólise da queratina	7
1.5 Microrganismos queratinolíticos	9
1.6 Aplicação das enzimas queratinolíticas	10
1.7 Aplicação dos hidrolisados de queratina	13
2 JUSTIFICATIVA	16
3 OBJETIVOS	17
3.1 Objetivos gerais	17
3.2 Objetivos específicos	17
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
4.1 Preparo das soluções.....	18
4.1.1 Preparo dos tampões.....	18
4.1.2 Preparo das enzimas	19
4.1.3 Preparo das soluções de agentes redutores	19
4.2 Preparo das penas	20
4.3 Reação enzimática	20
4.4 Dosagem de proteínas.....	21
5 RESULTADOS	22
5.1 Degradação de penas pela enzima P6110 (Flavourzyme®; protease de <i>Aspergillus Oryzae</i>)	22
5.2 Degradação de penas pela enzima P4860 (Alcalase®, protease de <i>Bacillus licheniformis</i>).....	25
6 DISCUSSÃO	28
7 CONCLUSÕES	31
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
ANEXOS	36

1 INTRODUÇÃO

1.1 Produção avícola

A domesticação de animais para consumo humano é uma prática que remonta a milhares de anos, e a criação de galinhas domésticas é um exemplo claro disso. Segundo o livro " *The Chicken A Natural History*" de Barber e seus colaboradores, as primeiras evidências de galinhas domésticas foram encontradas na China, datadas de cerca de 5400 a.C., indicando que a prática da domesticação de animais para obtenção de carne, ovos e penas é uma tradição antiga que remonta a muitas gerações (Barber *et al.*, 2018).

Com o surgimento de novas tecnologias, o setor avícola foi se automatizando para produção em larga escala, e nos dias de hoje, a produção de carne de frango é uma das principais atividades econômicas em muitos países do mundo, respondendo por quase 40% da produção global de carne, com expectativa de crescimento. De acordo com o relatório da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), a produção global anual de aves é projetada para atingir mais de 24,8 bilhões de animais em 2030, e 37,0 bilhões em 2050 (FAO, 2022). Somente em 2022, a produção global de carne de frango atingiu aproximadamente 107,5 milhões de toneladas (USDA, 2022). O Brasil se destaca como o terceiro maior produtor mundial de frangos de corte, produzindo cerca de 14,5 milhões de toneladas por ano (Embrapa, 2024). Além disso, o país registrou um abate de 6,11 bilhões de frangos no ano de 2022 (IBGE, 2023).

No entanto, a criação em larga escala de frangos para abate tem um impacto significativo no meio ambiente, especialmente no que diz respeito à geração de resíduos. De acordo com Garcia e seus colaboradores (2003), apenas uma porcentagem entre 34% e 52% do peso total da carne desses animais abatidos é para consumo humano, enquanto o restante é composto por subprodutos, como vísceras, esterco, sangue e penas. As penas são um dos principais resíduos gerados pela indústria avícola, sendo geralmente destinadas à incineração ou ao despejo em aterros sanitários (Garcia *et al.*, 2003; Šafaric *et al.*, 2020).

Infelizmente, essas práticas inadequadas de gerenciamento de resíduos geram emissões tóxicas na atmosfera, além de contaminar o solo e águas subterrâneas. A incineração de penas, por exemplo, emite gases como dióxido de carbono, dióxido de enxofre, monóxido de carbono e óxidos de nitrogênio, enquanto as penas que se decompõem nos aterros sanitários geram lixiviado e gás metano. Portanto, é crucial que sejam adotadas alternativas mais sustentáveis e

de maior valor agregado para o tratamento adequado desses resíduos (Kacprzak *et al.*, 2023; Cheng *et al.*, 2023).

1.2 Penas de frango

As penas são consideradas uma fonte renovável de biopolímeros biodegradáveis, representando cerca de 5 a 7 % do peso do frango, sendo composta por cerca de 90% de queratina. As penas desempenham diversas funções importantes para a ave, como proteção a fatores externos, isolamento térmico e locomoção. Em relação a sua estrutura, são compostas por um eixo central (raque) e pelos filamentos laterais (barbas), que são unidos por ganchos (barbicelos) formando uma estrutura semelhante a um zíper (Figura 1) (Kurien *et al.*, 2022; Qiu *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2013).

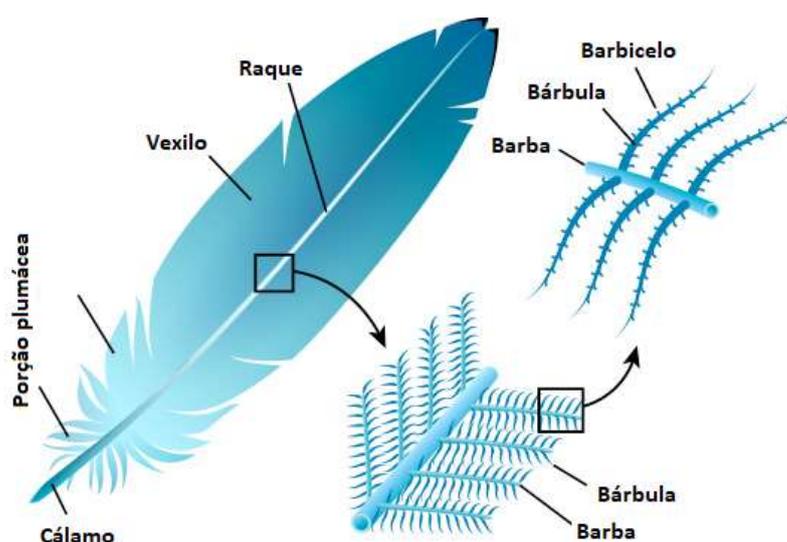


Figura 1- Estrutura das penas de aves. Adaptado de <https://askabiologist.asu.edu/explore/feather-biology>.

As penas são constantemente produzidas pela indústria avícola, sendo responsáveis pela geração anual de cerca de 8,5 milhões de toneladas mundialmente. Tendo em vista que as penas são compostas majoritariamente por queratina, é notável a grande quantidade de queratina disponível nesse setor. É crucial aprimorar a utilização desses materiais de maneira mais eficiente, não somente por questões ambientais, mas também pelo fato de possuírem características excelentes e um baixo custo. Dentre as características podemos citar uma baixa densidade, alta flexibilidade, alta compressibilidade, alta capacidade de retenção de calor, isolamento acústico e rica estrutura proteica, fatores esses que tornam as penas ótimas para aplicações de maior valor agregado (Peng *et al.*, 2020; Šafaric *et al.*, 2020).

No Brasil, parte desse resíduo é destinado a processos de compostagem para a produção de adubos e fertilizantes, além de servir como matéria prima para produção de ração animal. Além disso, existem maneiras inovadoras de reutilizar esse material, sendo usadas como material de enchimento em substituição a outros materiais, como espuma ou algodão. Existem ainda projetos que a utilizam na construção, como um material de isolamento térmico e acústico em paredes, tetos e pisos. No entanto, a queratina apresenta problemas semelhantes aos observados na celulose. Para aplicações mais nobres, é crucial que as penas sejam submetidas a pré-tratamentos, esses tratamentos são opções desejáveis, uma vez que disponibilizam a queratina e seus constituintes para aplicações de maior valor agregado (Šafaric *et al.*, 2020; Navone *et al.*, 2018).

1.2.1 Queratina

A queratina, além de estar presente nas penas, é o componente majoritário dos revestimentos naturais dos animais, como a epiderme, cabelos, pelos, escamas, cascos e chifres. É uma proteína insolúvel que apresenta aminoácidos que formam cadeias altamente enoveladas estabilizadas por pontes dissulfeto intramoleculares e intermoleculares, além de ligações iônicas, de hidrogênio e hidrofóbicas (Mazotto *et al.*, 2013; Pulidori *et al.*, 2021). Os aminoácidos constituintes incluem cisteína, glicina, arginina, serina, prolina, valina, leucina, treonina, glutamato e aspartato, com níveis baixos de histidina, lisina e metionina. A cisteína destaca-se por ser capaz de formar pontes dissulfeto com cisteínas adjacentes (intracadeia e intercadeia), o que mantém a estrutura tridimensional da proteína, tornando-a estável, compacta e resistente a proteases comuns. Além disso, a presença de glicina contribui para a hidrofobicidade, dureza e resistência a degradação das queratinas, chegando a concentrações maiores que 28% em materiais como cascos de tartaruga e bico de aves (Perta-Crisan *et al.*, 2021; Alahyaribeik e Ullah, 2020; Qiu *et al.*, 2020).

As queratinas podem ser classificadas em dois tipos principais, dependendo da quantidade de cisteína presente: queratina mole (*soft keratin*) e queratina dura (*hard keratin*). A queratina das penas é considerada uma queratina dura, tendo aproximadamente 7% de cisteína em sua composição (Peng *et al.*, 2020). Além disso, a queratina também é classificada com base em sua estrutura secundária em alfa-queratina e beta-queratina. A alfa-queratina é composta por duas hélices, uma hélice básica e outra ácida, que são enoveladas e estabilizadas por pontes dissulfeto e ligações de hidrogênio. A beta-queratina é formada por quatro fitas paralelas mantidas pelas pontes de hidrogênio dos grupos C=O e N-H entre duas ou mais

cadeias polipeptídicas adjacentes, formando pequenas superfícies planas rígidas levemente dobradas juntas na forma de um arranjo plissado. Duas dessas estruturas monoméricas se juntam através de empilhamento reverso para formar um dímero por meio de interações hidrofóbicas, no qual os aminoácidos sulfurados formam ligações dissulfeto, enquanto outros aminoácidos se ligam através de ligações iônicas e pontes de hidrogênio. Quatro desses dímeros interagem para formar uma estrutura helicoidal com essas folhas beta, que é mantida por ligações dissulfeto e pontes de hidrogênio (Figura 2) (Qiu *et al.*, 2020; Navone *et al.*, 2018).

As penas contêm queratinas com diferentes conformações, incluindo hélices α (32,2%), folhas β -pregueadas (53,6%) e regiões amorfas (14,2%). A proporção dessas conformações varia de acordo com a parte da pena, como a raque, as barbas ou as bárbulas. Enquanto a estrutura em folha β -pregueada é plana e rígida, a hélice α confere elasticidade, o que pode explicar por que a raque, que é a parte central e mais rica em folha β -pregueada, é mais rígida e resistente à degradação do que as barbas e bárbulas (Qiu *et al.*, 2020).

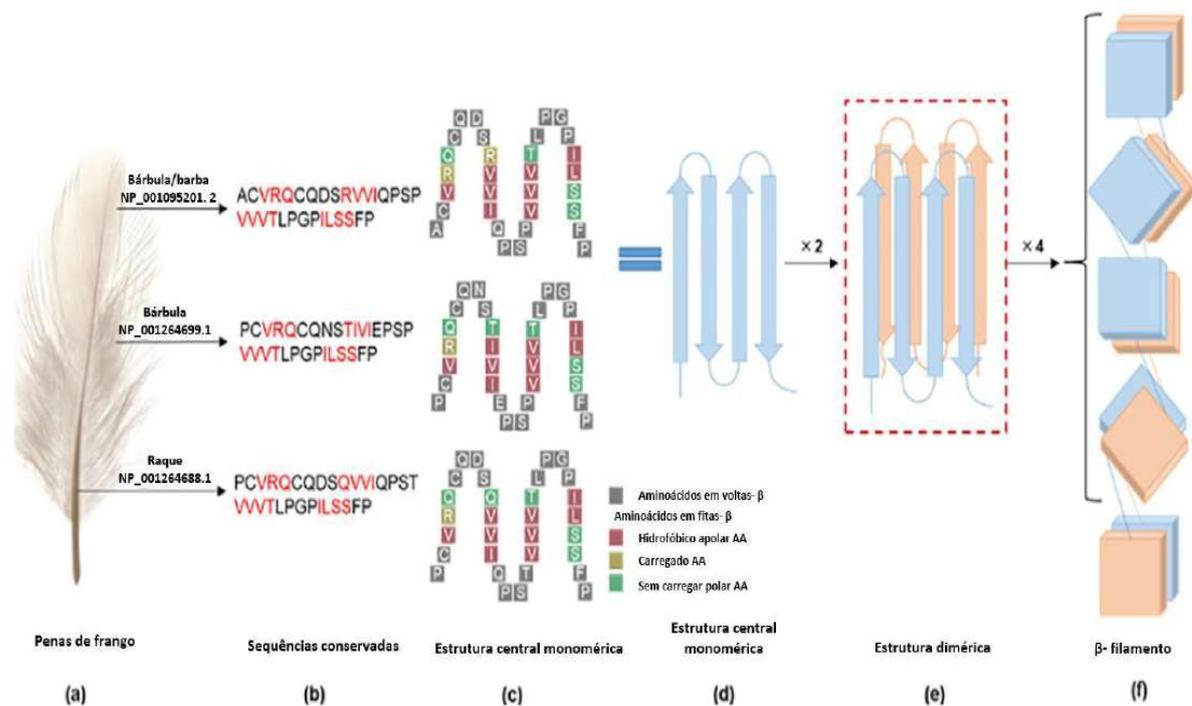


Figura 2 - Estrutura da pena e estrutura secundária da β -queratina. (a) A estrutura das penas apontando suas partes principais: bárbulas/farpas, barbas, raque; (b) Aminoácidos conservados das bárbulas/farpas (número de acesso NCBI: NP_001095201.2), barbas (NP_001264699.1) e raque de penas (NP_001264688.1) com as fitas β em cada sequência indicada em vermelho; (c) A estrutura central monomérica da β -queratina nas penas baseada na composição de aminoácidos. (d) A estrutura monomérica central da β -queratina, onde as quatro fitas são usualmente antiparalelas; (e) Estrutura dimérica (β -sanduíche) de β -queratina; (f) A estrutura básica de repetição dos filamentos β , com os quatro dímeros girados em aprox. 45° para formar uma estrutura helicoidal, com o quinto dímero na parte inferior assumindo uma posição sanduíche invertida em relação ao primeiro dímero (Adaptado de Qiu *et al.*, 2020).

1.3 Peptidases

As peptidases, também conhecidas como proteases ou enzimas proteolíticas, são enzimas hidrolíticas que catalisam a hidrólise de uma molécula de água juntamente com a quebra de ligações peptídica liberando peptídeos de tamanhos variados ou aminoácidos. Elas estão presentes em todos os organismos vivos, desde bactérias até seres humanos, e desempenham um papel importante em diversos processos biológicos, como a digestão de alimentos, síntese de proteínas e a degradação de proteínas. (Razzaq *et al.*, 2019). De acordo com a EC (*Enzyme Commission*), as proteases pertencem à classe 3 e são agrupadas entre as que hidrolisam ligações peptídicas (EC 3.4). Algumas características das proteases podem classificá-las em diferentes grupos, essas características incluem: sob qual pH a peptidase tem maior atividade, os aminoácidos ou íons presentes em seu sítio ativo, em quais tipos de ligações químicas ou em qual local do substrato irão ocorrer as clivagens realizadas por cada peptidase. Quanto ao local de ação sobre os substratos, as peptidases são divididas em dois grandes grupos: exopeptidases e endopeptidases (Kermasha e Eskin, 2021; Gurumallesh *et al.*, 2019). As endopeptidases, como o próprio nome sugere, clivam as ligações peptídicas em pontos internos das proteínas, gerando peptídeos menores. Elas são responsáveis por quebrar as proteínas em fragmentos que são posteriormente processados pelas exopeptidases. As exopeptidases, por sua vez, clivam as ligações peptídicas em pontos terminais das proteínas próxima ao C ou N terminal do substrato, podendo ser denominadas carboxipeptidases ou aminopeptidases (Figura 3) (Gurumallesh *et al.*, 2019). Outra classificação do grupo das proteases é baseada nos componentes presentes em seu sítio ativo, com base nisso o banco de dados das proteases (MEROPS) agrupa as peptidases em famílias: aspártico (A), cisteína (C), glutâmico (G), metalo (M), asparagina (N), misto (P), serina (S), treonina (T) e desconhecido (U) (MEROPS, 2023; Rawlings *et al.*, 2018). Além disso, temos a classificação com base no pH de atuação, sendo as peptidases classificadas como ácidas, neutras ou alcalinas (Gurumallesh *et al.*, 2019; Razzaq *et al.*, 2019).

As peptidases são enzimas que apresentam grande importância industrial, tendo aplicações em diversas áreas. Na indústria alimentícia, elas são amplamente utilizadas para melhorar a textura, aroma e sabor dos alimentos, além de aumentar a digestibilidade de proteínas e reduzir a formação de produtos indesejáveis durante o processamento. Na indústria farmacêutica, as peptidases são usadas para produzir medicamentos e terapias biológicas, como enzimas terapêuticas, peptídeos bioativos e anticorpos. Já na indústria de limpeza, as proteases são importantes componentes de detergentes, ajudando a remover manchas e sujeiras de tecidos

e superfícies. Além disso, as peptidases também são utilizadas na produção de hidrolisados proteico, sendo fonte de aminoácidos e peptídeos na suplementação alimentar (Razzaq *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2013). Dentre as peptidases, as queratinases vêm se destacando cada vez mais, sendo usadas para a produção de hidrolisados proteicos a partir de resíduos de animais ricos em queratina.

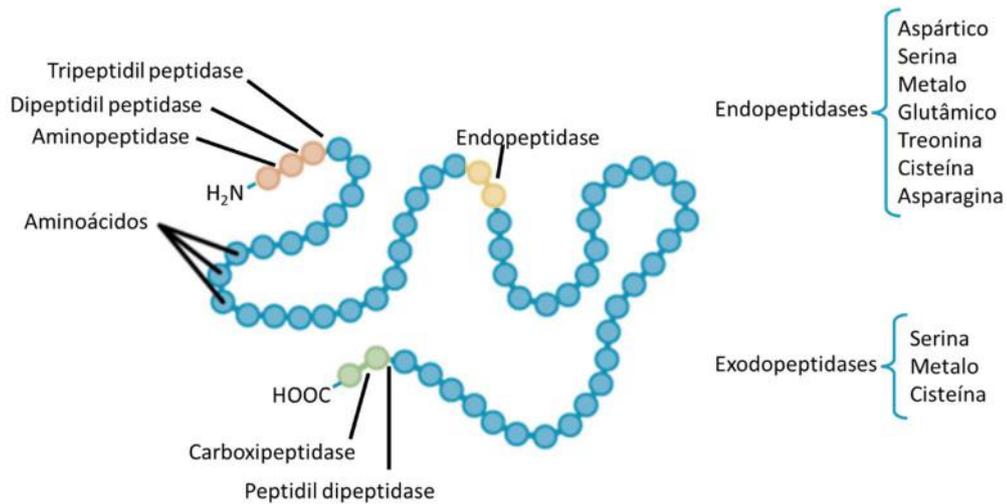


Figura 3 – Classificação das peptidases de acordo com a local de clivagem e aminoácido ou molécula presente no sítio ativo (fonte: autoral).

3.1 Queratinases

As queratinases (E.C.3.4.21/24/99.11) são peptidases de importância biotecnológica, pertencentes predominantemente às classes das serina peptidases ou metalopeptidases, com a capacidade de hidrolisar materiais queratinosos, como cabelos, penas, escamas, cascos e unhas. Diferentemente de peptidases convencionais, como a pepsina e papaína, que não possuem a habilidade de hidrolisar a queratina, as queratinases são capazes de degradar queratina por meio da hidrólise de ligações peptídicas presentes nesses materiais (Mazotto *et al.*, 2022; Navone *et al.*, 2018).

Essas enzimas são divididas em 14 famílias diferentes, como S1, S8, S9, S10, S16, M3, M4, M14, M16, M28, M32, M36, M38 e M55. As enzimas queratinolíticas realizam reações específicas, como ataque endo, exo ou ação apenas em oligopeptídeos, dependendo da família a qual pertencem. As serina peptidases são membros das famílias S1, S9, S8, S10 e S16, enquanto as metalopeptidases incluem membros das famílias M3, M4, M14, M16, M28, M32, M36, M38 e M55. As diferentes famílias de queratinases assumem funções distintas no processo de degradação da queratina devido às diferenças em seus sítios ativos, preferências

por sítios de clivagem de substratos e reconhecimento do comprimento dos aminoácidos (Qui *et al.*, 2020).

Diversos microrganismos são conhecidos por secretar enzimas queratinolíticas, eles são encontrados em ambientes ricos em queratina. A ampla diversidade de microrganismos queratinolíticos, que colonizam diferentes habitats, sugere que as enzimas queratinolíticas podem apresentar uma grande variabilidade em termos de modo de ação, propriedades bioquímicas e biofísicas (Hassan *et al.*, 2020; Qiu *et al.*, 2020). As queratinases têm potencial para substituir diversos métodos comumente usados na indústria, sendo uma alternativa viável em substituição a métodos muitas vezes danosos ao meio ambiente e ao próprio material a base de queratina (Verma *et al.*, 2017; De Oliveira Martinez *et al.*, 2020)

A maioria das pesquisas sobre a degradação microbiana de queratina foi conduzida utilizando caldo de cultura de células inteiras para testar as capacidades de decomposição dos micro-organismos, sem se concentrar nos componentes individuais envolvidos na degradação. Para desenvolver um produto de degradação de queratina eficaz, é necessário primeiro caracterizar os componentes envolvidos na catálise para otimizar suas aplicações. Além disso, uma melhor compreensão do desempenho da queratinase em relação a substratos específicos poderia facilitar a geração de novas formulações direcionadas a aplicações particulares. É fundamental, portanto, explorar a diversidade e a complexidade das queratinases para avançar na sua aplicação e utilização em processos biotecnológicos (De Menezes *et al.*, 2021; Navone *et al.*, 2018).

1.4 Mecanismo de hidrólise da queratina

A queratina é uma proteína altamente resistente à hidrólise devido à sua estrutura rígida composta por α -hélices e folhas β , além de pontes dissulfeto, ligações de hidrogênio e pontes salinas. A hidrólise da queratina é um processo desafiador que requer o uso de métodos adequados para quebrar as ligações de dissulfeto e desestabilizar as interações intermoleculares.

A extração de queratina é um processo desafiador que envolve a quebra das ligações dissulfeto e interações não covalentes presentes na estrutura proteica. Embora os métodos térmicos e termoquímicos, como o aquecimento a alta temperatura e pressão em solução ácida ou alcalina, sejam conhecidos por clivar as ligações dissulfeto, esses métodos têm um alto custo de energia e podem degradar aminoácidos termolábeis (Hassan *et al.*, 2020; Mazotto *et al.*, 2017). O uso de agentes redutores, como o uso de β -mercaptoetanol e metabissulfito, têm sido amplamente utilizados para a extração de queratina devido à sua capacidade de quebrar as

ligações dissulfeto, hidrogênio e salinas presentes na estrutura proteica, no entanto, esses agentes são tóxicos (Pulidori *et al.*, 2021; Gupta *et al.*, 2013). A crescente demanda mundial por novas tecnologias e processos ecologicamente seguros, que visam reduzir o uso de compostos químicos prejudiciais ao meio ambiente, faz com que a tecnologia enzimática seja considerada um substituto viável frente a esses tratamentos.

A hidrólise enzimática mediada por micro-organismos queratinolíticos tem se destacado como um método eficiente e ambientalmente sustentável. A degradação de materiais a base de queratina depende de uma gama de peptidases (tais como endo-, exo-, e oligopeptidases) e enzimas coadjuvantes, como dissulfeto redutases, ou por meio de reações de oxido redução envolvendo sulfitos (Qiu *et al.* 2020; De Menezes *et al.*, 2021). O processo de biodegradação é mais lento em comparação com os métodos físico-químicos, necessitando de condições específicas de pH, temperatura e nutrientes para o crescimento do micro-organismo e produção de enzimas com atividade enzimática sobre a queratina, podendo aumentar a complexidade do processo e os custos associados. Por outro lado, a hidrólise da queratina por enzimas purificadas é usualmente mais simples, sendo mais rápida, com possibilidade de moderação das condições do processo, controle na especificidade de reação, preservação de aminoácidos e controle do grau de hidrólise. No entanto a disponibilidade comercial de queratinases específicas ainda é limitada, além de terem um alto custo, conferindo uma desvantagem importante.

No geral, o processo de hidrólise enzimática da queratina envolve a redução das ligações dissulfeto e a hidrólise da cadeia polipeptídica por peptidases. Dois processos são conhecidos como sendo responsáveis pela quebra das ligações dissulfeto (Hassan *et al.*, 2020). A presença de agentes redutores como sulfito, cisteínas, glutathione, ácido glicólico induz a sulfitólise da ligação dissulfeto. Esses agentes redutores se ligam às duas cisteínas ligadas através da ponte dissulfeto (cistina), levando à formação de cisteína e S-sulfocisteína (Perta-Crisan *et al.*, 2021). Além disso, um segundo mecanismo de sulfitólise pode ser mediado por enzimas redutoras de sulfeto, tais como a cisteína dioxigenase e a glutathione redutase. Estas enzimas transferem elétrons para as ligações dissulfeto presentes na molécula de queratina, promovendo a redução das pontes dissulfeto (-S-S-) para grupos tióis (-SH). Ambos os processos clivam as pontes dissulfeto e resultam na exposição dos sítios peptídicos da queratina, o que permite o acesso das enzimas ao sítio alvo provocando a quebra das ligações peptídicas (Perta-Crisan *et al.*, 2021; Hassan *et al.*, 2020).

Em contrapartida, existem relatos na literatura, descrevendo enzimas capazes de realizar a atividade queratinolítica sem a necessidade de enzimas auxiliares ou agentes redutores. Estudos indicam que algumas queratinases purificadas conseguem hidrolisar a queratina de

forma independente. Entre elas estão as serino queratinases de *Bacillus thuringiensis* AD-12, *Actinomadura keratinolytica* Cpt29, *Bacillus pumilus* K-9, *Caldicoprobacter algeriensis*, *Bacillus subtilis* DP1 e as metaloproteases de *Acinetobacter* sp. R-1 e *Bacillus pumilus* NRC21. (Duffeck, 2020)

A literatura científica tem apontado que a combinação de tratamento químico e hidrólise enzimática representa um método mais eficaz para produzir concentrados proteicos ou hidrolisados de queratina a partir de penas. Esse método requer a exposição do substrato de penas a uma solução alcalina contendo um agente redutor, o que promove a redução das ligações dissulfeto e, conseqüentemente, a abertura da estrutura proteica, melhorando a acessibilidade da enzima aos sítios ativos. Dessa forma, o processo permite uma hidrólise enzimática mais eficiente, resultando em um aproveitamento mais completo da queratina presente nas penas (Mokrejs *et al.*, 2011).

1.5 Microrganismos queratinolíticos

A queratina é uma biomassa continuamente produzida na natureza, sua presença estimula a secreção de queratinases por alguns microrganismos, que utilizam a queratina como fonte de energia, carbono, enxofre e nitrogênio. A capacidade dos microrganismos em utilizar a queratina como fonte de nutrientes é um fenômeno importante, uma vez que promove a reciclagem de resíduos ricos em queratina. Os microrganismos queratinolíticos são encontrados em diversos ambientes, incluindo aterros com resíduos avícolas, solos com alta quantidade de matéria orgânica, água de regiões próximas a matadouros de animais, superfícies de pele, ninhos e pellets de pássaros, entre outros (De Menezes *et al.*, 2021; Srivastava *et al.*, 2020; Hassan *et al.*, 2020)

Queratinases são produzidas por uma vasta variedade de bactérias, entre elas os actinomicetos, e fungos. As bactérias queratinolíticas são as que mais predominam em relação a degradação de queratina. Entre as bactérias queratinolíticas, as espécies de *Bacillus* foram encontradas como as principais produtoras de queratinase. Estudos anteriores relataram que várias espécies de *Bacillus* são capazes de produzir queratinase, incluindo *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. pumilus* e *B. cereus*. Algumas bactérias gram-negativas são capazes de produzir queratinases como *Fervidobacterium* sp., *Serratia* sp., *Lysobacter* sp. e *Pseudomonas* sp., algumas são termofílicas, sendo capazes de produzir queratinases termoestáveis, como *Chryseobacterium* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Xanthomonas* sp. e *Vibrio* sp. Além disso, algumas espécies do gênero *Fervidobacterium* (Thermotogae), que são bactérias anaeróbicas e

hipertermofílicas, apresentam potencial para decompor completamente resíduos de penas, gerando queratinases promissoras para aplicações industriais com alta atividade.

Os actinomicetos queratinolíticos são encontrados em diversas fontes e mostram capacidade para catalisar a hidrólise de diferentes substratos queratinosos com variadas estruturas. Dentre os actinomicetos, o gênero *Streptomyces* tem sido amplamente utilizado para a biodegradação da queratina, produzindo diversos compostos importantes (Hassan *et al.*, 2020). Os fungos produtores de queratinases, podem ser encontrados em solos com alta presença de material queratinoso, ambiente onde fungos saprófitas, como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Trichoderma* são os mais encontrados. Além disso, a maioria das enzimas queratinolíticas foram descritas em dermatófitos como *Microsporum* sp. e *Trichophyton* sp (Descamps *et al.*, 2002; Zaugg *et al.*, 2008). Embora alguns fungos produzam queratinases em grandes quantidades e com baixos custo, muitos desses fungos apresentam patogenicidade, o que faz com que sua aplicação em processos biotecnológicos não seja viável (Hassan *et al.*, 2020; Srivastava *et al.*, 2020; Zorro *et al.*, 2018).

1.6 Aplicação das enzimas queratinolíticas

As enzimas queratinolíticas, ou queratinases, microbianas são uma classe importante de enzimas industriais devido à sua capacidade de degradar materiais a base de queratina, sendo consideradas uma das enzimas industriais mais importantes em comparação às proteases convencionais. As queratinases têm um papel fundamental no tratamento de resíduos sólidos industriais, como no setor avícola. Além disso, elas podem ser exploradas para ração animal, fertilizantes, detergentes, indústrias de couro e têxtil, aplicações farmacêuticas e biomédicas (Figura 4) (Hassan *et al.*, 2020; Srivastava *et al.*, 2020).

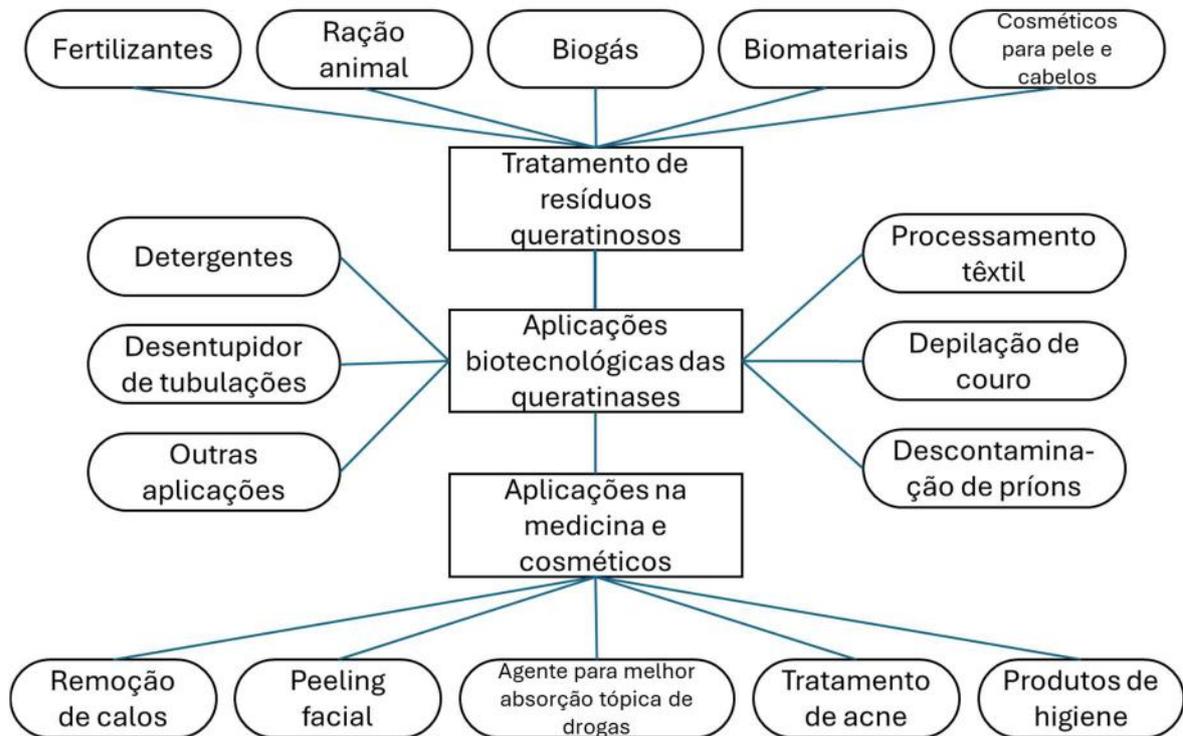


Figura 4 - Aplicação biotecnológica das queratinases. Adaptado de Vidmar e Vodovnik, 2018.

Várias queratinases têm sido produzidas e comercializadas, demonstrando aplicação em vários setores. A maioria delas são serina endopeptidases obtidas a partir de espécies de *Bacillus* pertencentes à família S8 de peptidases. Essas enzimas são do tipo subtilisina, tendo uma ótima capacidade de hidrolisar proteínas incluindo a queratina, podendo ser utilizadas na indústria de detergentes, couro e processamento de alimentos (Hassan *et al.*, 2020).

Essas proteases são muito importantes no tratamento de resíduos sólidos como por exemplo as penas. A geração massiva de penas causa um alto impacto ambiental, adicionalmente a isso, os métodos de tratamentos físico e químicos são altamente custosos e demandam muita energia além de destruir alguns aminoácidos essenciais, como metionina, lisina e triptofano (Srivastava *et al.*, 2020). Uma alternativa viável é a hidrólise enzimática das penas por meio de queratinases. A hidrólise de resíduos de penas produz subprodutos valiosos, como suplementos alimentares, fertilizantes, aminoácidos e produção de antioxidantes. Além disso, hidrolisados de proteínas podem produzir peptídeos antibacterianos. Outra investigação comprovou a hidrólise de penas por *Bacillus* sp. CL18, demonstrando que o aumento do substrato aumentou a concentração das proteínas solúveis liberadas. Além disso, o hidrolisado de penas mostrou atividades antioxidantes, anti-hipertensivas e antidiabéticas *in vitro*, o que

exige mais investigações para aplicação *in vivo* no tratamento de doenças (Reddy *et al.*, 2021; Hassan *et al* 2020).

No setor têxtil as queratinases são usadas para processar fibras de lã, visto que ela é composta por queratina. Atualmente, o processamento de fibras de lã envolve o uso de produtos químicos como cloretos orgânicos, que podem causar a perda de características naturais da lã, amarelecimento do material e poluição da água residual, além do alto consumo de energia e tempo. No entanto, o uso de enzimas queratinolíticas se mostram uma alternativa melhor e mais seletiva, atuando apenas nas camadas superficiais da lã, sem causar danos, perdas de massa e de resistência à tração. Embora as preparações enzimáticas ainda não sejam exclusivamente baseadas em queratinases, essas enzimas têm se mostrado cada vez mais importantes para substituir os métodos químicos e físicos tradicionais, apresentando uma série de vantagens, como a seletividade, a produção de subprodutos valiosos e a redução do impacto ambiental. Mais pesquisas são necessárias para aprimorar as aplicações das queratinases e otimizar os processos de produção em larga escala (Hassan *et al.*, 2020; Srivastava *et al.*, 2020).

As queratinases são enzimas com grande potencial de aplicação na indústria do couro. A sua utilização permite melhorar a qualidade do produto final, reduzindo o uso de produtos químicos tóxicos e minimizando a poluição ambiental. As queratinases são capazes de hidrolisar a queratina presente na pele animal, tornando-a mais macia e preparada para o processo de curtimento. Além disso, elas também são utilizadas para remover os pelos do animal sem prejudicar a resistência da pele. A utilização de queratinases na indústria do couro traz benefícios para a preservação do meio ambiente, assim como para a qualidade do produto final. No entanto, é importante ressaltar que a sua utilização em larga escala ainda enfrenta desafios, como a baixa estabilidade e atividade em condições de processamento industrial e o alto custo de produção e purificação dessas enzimas. Portanto, é necessário o desenvolvimento de novas abordagens que tornem o uso dessas enzimas economicamente viável para essa aplicação (Hassan *et al.*, 2020; Srivastava *et al.*, 2020; Vidmar e Vodovnik, 2018).

As queratinases têm sido amplamente utilizadas na indústria de cosméticos para tratar uma variedade de problemas dermatológicos, tais como acne, calos, remoção de pele ressecada e queratinizada, bem como no tratamento de condições como a psoríase. Na indústria farmacêutica, as aplicações das queratinases estão relacionadas principalmente à otimização da absorção de medicamentos e outros compostos por meio da superfície queratinizada presente nos tecidos afetados. As queratinases também têm sido investigadas em estudos pré-clínicos e clínicos como um potencial terapia para o tratamento de doenças dermatológicas, como a dermatite atópica e a ictiose. Além disso, essas enzimas têm sido exploradas como agentes

biotecnológicos para a produção de cosméticos e produtos de cuidados pessoais, tais como xampus, condicionadores, loções e cremes para a pele, devido às suas propriedades degradativas de queratina e capacidade de melhorar a textura e a aparência da pele e cabelo (Hassan *et al.*, 2020; Gupta *et al.*, 2013).

As queratinases têm sido amplamente utilizadas na produção de hidrolisados de queratina, sendo uma alternativa promissora para o tratamento de resíduos queratinosos. Essas enzimas oferecem vantagens em relação aos métodos tradicionais, como condições de processamento mais suaves, maior seletividade e a capacidade de recuperar uma quantidade maior de aminoácidos para a produção de produtos com maior valor agregado. A bioconversão enzimática de substratos queratinosos tem sido explorada para a obtenção de hidrolisados proteicos com alta diversidade de peptídeos e aminoácidos, proporcionando uma ampla gama de aplicações (Nnolim *et al.*, 2020; Gupta *et al.*, 2013).

1.7 Aplicação dos hidrolisados de queratina

Os hidrolisados de proteínas são complexas misturas de peptídeos e aminoácidos, gerados pela quebra das ligações peptídicas dentro das cadeias polipeptídicas. A escolha da estratégia de hidrólise depende das características do substrato proteico, da disponibilidade de agentes de hidrólise apropriados, da qualidade do produto final e das aplicações desejadas do hidrolisado (De Menezes *et al.*, 2020). Na biotecnologia, os hidrolisados de proteínas são obtidos a partir do potencial proteolítico de micro-organismos ou peptidases microbianas, por meio de preparações de enzimas brutas ou parcialmente purificadas.

O processamento de penas para obtenção de hidrolisados proteicos apresenta uma ampla gama de aplicações industriais e comerciais. Na literatura, há diversas descrições do uso desses hidrolisados em diversas áreas, como fertilizantes orgânicos do solo, ingredientes de ração, formulações cosméticas, produtos farmacêuticos e até na produção de biocombustíveis. A digestão anaeróbia é um processo biológico promissor para a produção de energia renovável a partir de uma variedade de resíduos, como penas. Esse processo é descrito em duas etapas, sendo a primeira a produção de hidrolisados por meio da ação de microrganismos queratinolíticos. Esses materiais são hidrolisados em aminoácidos, que são então convertidos em ácidos orgânicos, como o ácido acético, amônia, dióxido de carbono, hidrogênio e pequenas quantidades de compostos de enxofre. Portanto, os hidrolisados de queratina são uma fonte

valiosa de nutrientes para a agricultura e pecuária, bem como uma fonte promissora de energia renovável (De Menezes *et al.*, 2021; Hassan *et al.*, 2020; Srivastava *et al.*, 2020).

A utilização de resíduos ricos em proteínas para produzir hidrolisados com atividades biológicas apresenta grande interesse para o desenvolvimento de ingredientes funcionais de elevado valor agregado (Verma *et al.*, 2017; Martinez *et al.*, 2020; Srivastava *et al.*, 2020). Vários estudos têm descrito as capacidades de peptídeos bioativos com diversas atividades terapêuticas, tais como antimicrobiana, antioxidante, antiprotozoária, antitrombótica, antiviral, anti-tirosinase, efeito redutor do colesterol e atividades imunomodulatórias (Quin *et al.*, 2022; Sinkiewicz *et al.*, 2018). O potencial da hidrólise de proteínas para gerar peptídeos bioativos com essas atividades terapêuticas tem sido amplamente explorado, com destaque para o uso de resíduos ricos em queratina, como penas, como substrato para a produção desses peptídeos.

Um estudo conduzido por Kshetri e colaboradores demonstrou que o hidrolisado de penas produzido por bactérias queratinolíticas e queratinases gerou uma variedade de peptídeos bioativos com diferentes perfis proteicos ou peptídicos. Além disso, os peptídeos gerados apresentaram diversas bioatividades benéficas, tais como atividades antioxidantes, anti-tirosinase, inibitórias da ECA (Enzima Conversora de Angiotensina), inibitórias da LOX (lipoxigenase) e inibitórias da XO (xantina oxidase) (Kshetri *et al.*, 2022). Esses resultados reforçam o potencial da hidrólise de queratina para a produção de peptídeos bioativos com atividades terapêuticas diversas.

Na indústria de cosméticos, os hidrolisados de proteínas são amplamente utilizados como agentes restauradores em processos de cuidados com os cabelos. Esses peptídeos ativos possuem propriedades reparadoras e condicionantes, proporcionando benefícios significativos para o cabelo, como o fortalecimento das fibras capilares e a redução da quebra. Além disso, as proteínas apresentam um efeito protetor substancial sobre a estrutura capilar protegendo o cabelo contra danos químicos e do ambiente externo, tornando-as essenciais na formulação de produtos para cabelo. A inclusão desses hidrolisados em produtos para cabelos melhora não apenas a aparência, mas também a saúde geral do cabelo (Mazotto *et al.*, 2013).

Os hidrolisados de queratina obtidos a partir do processamento enzimático ou microbiano de penas são ricos em peptídeos, aminoácidos e minerais essenciais como fósforo, potássio, cálcio, ferro, manganês, zinco e cobre, que estão relacionados à composição das penas. Eles têm sido amplamente utilizados como fertilizantes naturais para plantas, devido ao seu conteúdo nutricionalmente equilibrado e útil, contendo aminoácidos livres, peptídeos e íons amônio. Os hidrolisados de penas têm sido reconhecidos por melhorar o metabolismo das plantas, aumentando a população microbiana no solo, melhorando a capacidade de retenção de

água, conteúdo de N, C, P, K e outros minerais no solo, favorecendo o crescimento das plantas. Além disso, também causam um aumento na superfície radicular e no número de pelos radiculares, estimulando a permeabilidade da membrana e melhorando a absorção de íons do solo (De menezes *et al.*, 2021; Hassan *et al.*, 2020).

Queratinases podem ser utilizadas como aditivos em rações para animais, ajudando a melhorar a digestibilidade e contribuindo para o aumento do peso dos animais. A adição de hidrolisados de penas à refeição de milho-soja na suplementação do gado melhorou significativamente a digestibilidade da proteína bruta, levando a um aumento no ganho de peso e na conversão alimentar (De Menezes *et al.*, 2021; Srivastava *et al.*, 2020).

A produção de hidrolisados proteicos a partir de biomassas ricas em queratina é uma área de grande interesse e com potencial de diversas aplicações. No entanto, ainda há espaço para melhorias no processo de hidrólise, com foco na otimização e adaptação do método, além do desenvolvimento de novas técnicas. A literatura científica tem apresentado um número crescente de relatos sobre o uso de diferentes enzimas e condições para a obtenção de peptídeos bioativos a partir de queratina. Cada sistema de hidrólise gera hidrolisados com diferentes rendimentos e composições de peptídeos e aminoácidos, o que pode afetar as aplicações potenciais desses produtos.

Ao considerar as diversas aplicações dos hidrolisados de queratina, é importante definir o objetivo principal da hidrólise. Para o uso como fertilizantes ou para produção de biocombustíveis, o objetivo pode ser simplesmente a quebra da biomassa rica em queratina, aumentando sua acessibilidade. No entanto, se o interesse estiver nas propriedades bioativas dos hidrolisados, é necessário que a hidrólise produza peptídeos específicos e com propriedades desejadas. Portanto, é fundamental que o processo de hidrólise seja cuidadosamente planejado e otimizado, levando em consideração as diferentes aplicações e as propriedades desejadas dos hidrolisados.

2 JUSTIFICATIVA

A geração de resíduos sólidos provenientes dos setores agroindustriais representa um desafio significativo que muitas vezes é subestimado. Grande parte desses resíduos é inadequadamente descartada, resultando em danos ambientais consideráveis e em um desperdício alarmante de matéria-prima. A crescente adoção dos princípios da Química Verde por empresas, em colaboração com instituições de ensino, para a pesquisa e desenvolvimento de alternativas sustentáveis, demonstra uma busca por soluções mais eficazes e ecologicamente responsáveis. Na avicultura a magnitude dos rejeitos decorrentes do abate de aves é notável. As penas, compostas predominantemente por queratina, representam uma parcela significativa desses rejeitos. Apesar de conterem quantidades substanciais de proteínas e aminoácidos, as penas são notoriamente resistentes e estáveis, o que impõe desafios consideráveis em termos de tratamento e reaproveitamento efetivo. A atual prática de destinação das penas para adubagem e cremação ilustra uma abordagem inadequada e limitada, que desperdiça uma considerável fonte de matéria-prima valiosa. Dadas as toneladas de penas produzidas anualmente no Brasil, a necessidade de explorar alternativas mais sustentáveis e economicamente viáveis é evidente. A busca por soluções inovadoras, como abordagens microbianas e enzimáticas, emerge como uma promissora linha de pesquisa. No entanto, é crucial reconhecer a complexidade do estudo dos componentes individuais envolvidos na degradação da queratina. A degradação eficiente e seletiva da queratina requer um profundo entendimento dos elementos envolvidos no processo. A análise individual desses elementos é fundamental para otimizar a formulação de produtos de degradação específicos, direcionados a aplicações bem definidas. Portanto, o presente estudo se propõe a contribuir para o preenchimento dessa lacuna de conhecimento, visando aprimorar a compreensão dos processos de degradação enzimática da queratina presentes nas penas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Explorar novas vias na hidrólise enzimática da queratina utilizando duas peptidases comerciais inespecíficas combinadas com cinco diferentes agentes redutores em diferentes concentrações.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade queratinolítica de duas enzimas inespecíficas de distintas fontes (Flavourzyme®, uma preparação comercial do extrato enzimático bruto de *Aspergillus oryzae*, e Alcalase®, uma serina endopeptidase de *Bacillus licheniformis*) utilizando penas picadas como substrato;
- Avaliar a atividade das supracitadas enzimas na presença de diferentes agentes redutores (sulfito de sódio, cisteína, bissulfito de sódio, ditioneitol e tioglicolato de sódio) em diferentes concentrações;
- Quantificar os hidrolisados das misturas reacionais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Preparo das soluções

Para a realização dos experimentos foram preparadas soluções de reagentes e tampão, incluindo soluções de agentes redutores e as soluções enzimáticas como descritos a seguir.

4.1.1 Preparo dos tampões

As reações enzimáticas foram realizadas em soluções tampão ácido cítrico pH (5,5) e o tampão fosfato pH (6,5). A solução de tampão ácido cítrico foi preparada através da mistura de ácido cítrico 0,1M e Na₂HPO₄ 0,2M conforme a **Tabela 1**. Esta solução foi utilizada para a diluição da enzima e dos agentes redutores das reações empregando a enzima Flavourzyme® (ativa entre pH 5-7).

Tabela 1 - Proporções (em volume) das soluções utilizadas para o preparo do tampão ácido cítrico. Em negrito está destacado o pH utilizado neste trabalho.

pH	Ácido cítrico (19,213 g/L)	Na₂HPO₄ (53,614g/L)
3,0	79,45 ml	20,55 ml
4,0	61,45 ml	38,55 ml
5,0	48,5 ml	51,5 ml
5,5	42 ml	58 ml
6,0	36,85 ml	63,16 ml

Para a diluição enzimática e dos agentes redutores nas reações utilizando a enzima Alcalase® (ativa entre pH 6,5 e 8,5) foi empregado o tampão fosfato 0,1M, preparado conforme a **Tabela 2**. Para ambos os tampões, após a realização da mistura pH foi verificado utilizando um potenciômetro (Medidor portátil de pH/EC/TDS/temperatura faixa baixa Hanna) e corrigido com as respectivas soluções ácidas e básicas do tampão, caso necessário.

Tabela 2 - Proporções (em volume) das soluções utilizadas para o preparo do tampão fosfato. Em negrito está destacado o pH utilizado neste trabalho.

pH	Na ₂ HPO ₄ 9,474 g/L	KH ₂ PO ₄ 9,078 g/L
6,0	12	88
6,5	31,1	68,9
7,0	60	40
7,2	72	28
7,4	80	20
7,6	87	13
7,8	91,2	8,8
8,0	95	5

4.1.2 Preparo das enzimas

As enzimas utilizadas neste trabalho foram a Flavourzyme® (preparação comercial líquida do extrato enzimático bruto de *Aspergillus oryzae*), e Alcalase® (preparação comercial líquida de serina endopeptidase de *Bacillus licheniformis*). Ambas as enzimas são originalmente produzidas pela Novozyme® e são comercializadas em pequenos volumes pela Sigma-Aldrich (Merck) sob os códigos P6110 (Protease de *Aspergillus oryzae*) e P4860 (Protease), respectivamente. Para o preparo das soluções empregadas nas reações enzimáticas, as enzimas foram diluídas na proporção 1:10 nas soluções tampão ácido cítrico e tampão fosfato, respectivamente. As enzimas serão chamadas por seus códigos no decorrer do texto.

4.1.3 Preparo das soluções de agentes redutores

Os agentes redutores usados foram o sulfito de sódio, cisteína, bissulfito de sódio em concentrações de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 % e ditioneína (DTT) e tioglicolato de sódio na concentração de 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 % diluídas em tampão ácido cítrico ou tampão fosfato.

4.2 Preparo das penas

As penas foram obtidas de uma granja local e levadas ao laboratório, ainda úmidas, logo após a depena. No laboratório as penas foram lavadas com detergente neutro em água corrente abundantemente, até que não estivessem visualmente limpas e inodoras. Após a lavagem, as penas foram distribuídas em bandejas para secagem a temperatura ambiente (24-48 h). Quando secas, as penas foram mergulhadas em solução de álcool 70%, onde permaneceram por 1 h. Após a limpeza com álcool, as penas foram retiradas da solução e novamente distribuídas em bandejas para secagem a temperatura ambiente. Secas, as penas foram armazenadas em sacos plásticos. Para as dosagens, as penas foram picadas em moinho de facas até obtenção de fragmentos entre 5-10 mm.

4.3 Reação enzimática

O substrato (0,004 g de penas picadas) foi pesado individualmente em microtubos de 1,5 ml e reservados para os ensaios enzimáticos. Para a reação com a enzima P6110, 900 µl de tampão ácido cítrico pH 5,5 com ou sem agentes redutores foram adicionados nos tubos, seguindo do acréscimo de 100 µl da solução enzimática. Os tubos foram incubados a temperatura de 50 °C durante 60 minutos. Após a incubação, a reação foi interrompida pela adição de 500 µl de TCA. Essas amostras foram preparadas em triplicatas, com 4 diferentes concentrações de cada agente redutor. Para o controle da reação, usou-se mais uma triplicata (tanto com quanto sem agentes redutores) nos quais foram adicionando 500 µl de TCA (ácido tricloroacético 10%), que interrompe as enzimas, antes da incubação em banho-maria.

Para a reação com a enzima P460 em foram adicionados aos tubos com penas 900 µl da solução de tampão fosfato em pH 6,5 (com ou sem agentes redutores) e 100 µl da solução enzimática, com uma hidrólise sendo conduzida na temperatura de 60 °C durante 60 minutos. Os tubos de reação e controle tiveram a atividade enzimática interrompida pela adição de 500 µl de TCA 10%. Os controles da reação foram feitos da mesma maneira, através da adição da solução de parada antes da incubação dos tubos.

Os tubos foram mantidos em congelador a -18°C para análises dos peptídeos produzidos pela hidrólise.

4.4 Dosagem de proteínas

Os tubos mantidos a -18°C foram descongelados a temperatura ambiente, centrifugados a 10000 rpm por 10 minutos, e foi retirada uma alíquota de 20 μL do sobrenadante usado para medir a concentração de proteínas presentes no sobrenadante segundo o método de Lowry *et al.* (1951), utilizando soro albumina bovina (1mg/ml) como padrão. A leitura foi realizada a 617 nm no espectrofotômetro (Kasuki UV-VIS/Largura de Banda espectral de 2nm). Para realizar a curva padrão foram utilizadas as seguintes concentrações de BSA diluídos em água destilada: 25, 50, 125, 250, 500, 750 e 1000 $\mu\text{g/l}$, o que corresponde a 5, 10, 25, 50, 100, 150 e 200 μg de proteína por tubo.

5 RESULTADOS

Esses ensaios tiveram como base três diferentes curvas-padrões apresentadas em anexo. Foi realizada uma curva padrão para cada bateria de ensaios: teste da ação do sulfito e bissulfito de sódio na hidrólise de penas com as enzimas P6110 e P4860; teste da ação de cisteína na hidrólise de penas com as enzimas P6110 e P4860; e teste da ação de DTT e tioglicolato de sódio com as enzimas P6110 e P4860.

5.1 Degradação de penas pela enzima P6110 (Flavourzyme®; protease de *Aspergillus Oryzae*)

A degradação de penas foi estimada através da concentração de peptídeos solúveis presente no sobrenadante de reação após precipitação com TCA 10% e centrifugação (10000 rpm por 10 min). A enzima P6110 não é capaz de hidrolisar queratina na ausência de um agente redutor. Os resultados de hidrólise de penas utilizando a enzima P6110 na presença de tioglicolato de sódio mostraram que houve hidrólise de penas suportada pela presença do agente redutor na concentração de 0,25% de tioglicolato de sódio. As amostras que correspondem ao “branco” (controle da reação com ativa inativada pela adição de TCA antes do período de incubação) mostram que o tioglicolato é capaz de degradar as penas, liberando peptídeos independente da presença da enzima, como observado nas concentrações de 1%, onde o controle apresentou concentração de proteínas superiores que a reação com a enzima (Figura 5). As reações foram realizadas em triplicada e todo o experimento foi repetido duas vezes, o resultado dos experimentos individuais estão no Anexo.

Quando cisteína foi adicionada, um ligeiro aumento na concentração de peptídeos foi observada quanto esta estava presente em concentrações superiores a 1,5% (Figura 6). Bissulfito de sódio aumentou a concentração de proteínas no sobrenadante de reação de 90 para 147 µg/ml de proteínas na mistura de reação da enzima P6110 quando este agente redutor foi utilizado a 2% (Figura 7). Já o DDT na concentração de 0,5% aumentou em quase 5 vezes a concentração de proteínas liberadas as penas (Figuras 8).

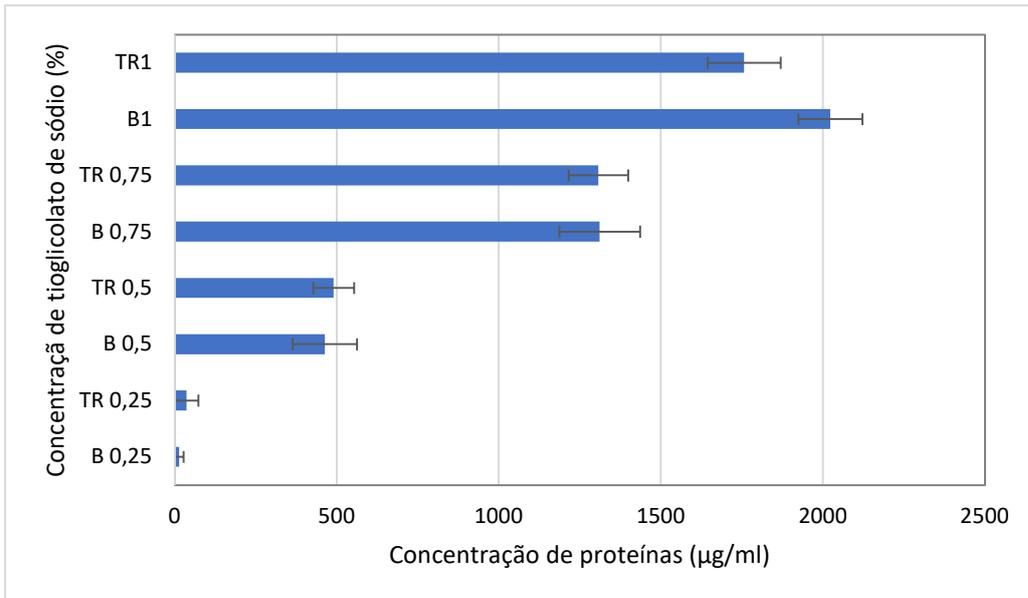


Figura 5 - Concentração de proteínas dos sobrenadantes gerados após a degradação de penas usando a enzima 6110 na presença de tioglicolato em quatro concentrações diferentes. TR= Tubo de reação e B= Controle com adição de TCA antes da reação.

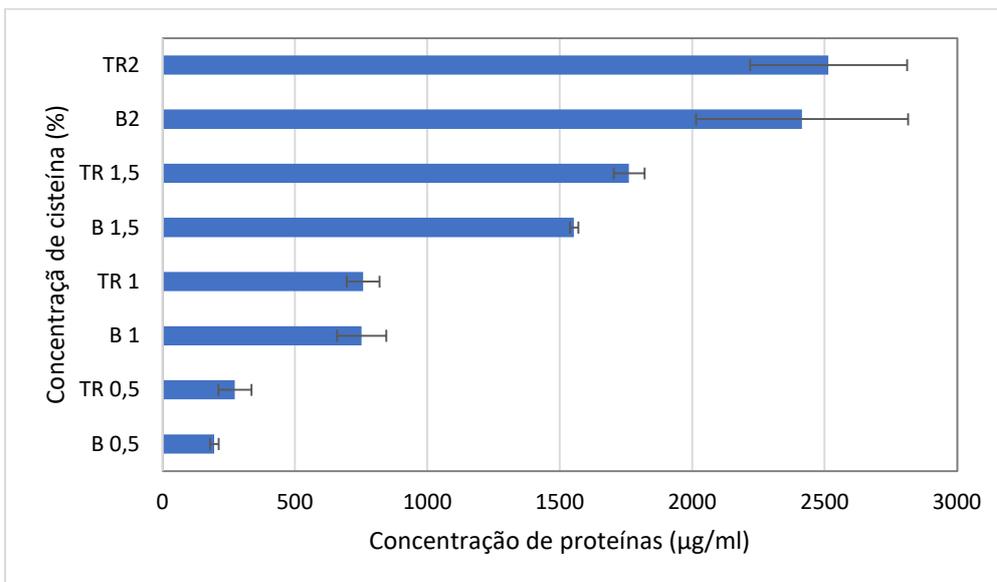


Figura 6 - Concentração de proteínas dos sobrenadantes gerados durante a degradação de penas usando a enzima 6110 na presença de cisteína em diferentes concentrações. TR = Tubo de reação e B = Controle com adição de TCA antes da reação.

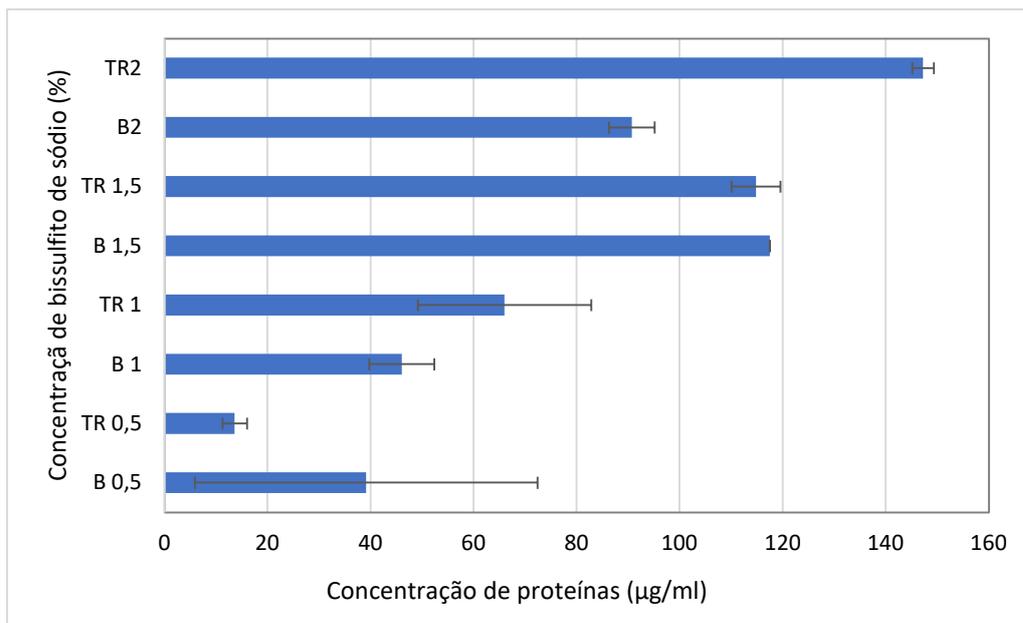


Figura 7 - Concentração de proteínas dos sobrenadantes gerados durante a degradação de penas usando a enzima P6110 na presença de bissulfito em quatro concentrações diferentes. TR = Tubo de reação e B = Controle com adição de TCA antes da reação.

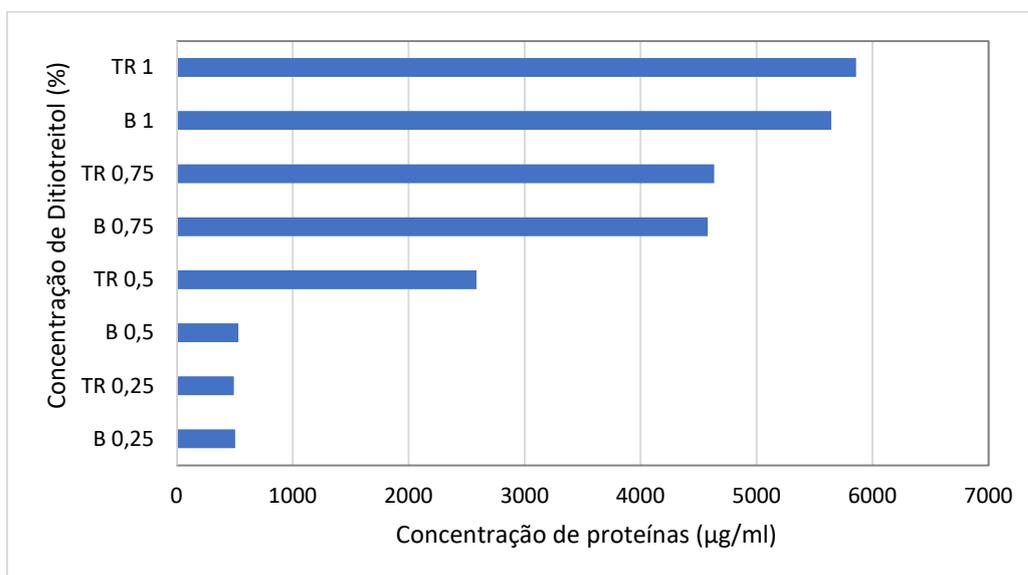


Figura 8 - Concentração de proteínas dos sobrenadantes gerados durante a degradação de penas usando a enzima 6110 na presença de DTT em 4 concentrações diferentes. TR = Tubo de reação e B = Controle com adição de TCA antes da reação.

5.2 Degradação de penas pela enzima P4860 (Alcalase®, protease de *Bacillus licheniformis*)

O tioglicolato de sódio, como observado na Figura 9, leva a uma degradação das penas e sua presença não aumenta de forma expressiva a atividade da peptidase P4860. Já o sulfito de sódio apresentou os melhores resultados quanto ao nível de proteínas no sobrenadante, ademais, aumentou a atividade da enzima sobre o substrato de 4 a 5 vezes (concentrações acima de 1,5%) e em 130 vezes na concentração de 0,5 % (Figura 10). A maior concentração de proteínas foi observada no tubo de reação contendo 2% de sulfito de sódio (2506 µl/ml). Resultados semelhantes foram observados para bissulfito de sódio, entretanto uma concentração menor de proteínas foi quantificada no sobrenadante de cultura (Figura 11)

A cisteína aumentou a degradação de penas pela enzima apenas na maior concentração testada (2%), aumento a quantidade de proteínas de 256,2 para 438,2 µl/ml (Figura 12), enquanto o DTT, sem ação enzimática, foi capaz de degradar as penas não havendo diferenças entre os tubos de reação e os controles (Figura 13).

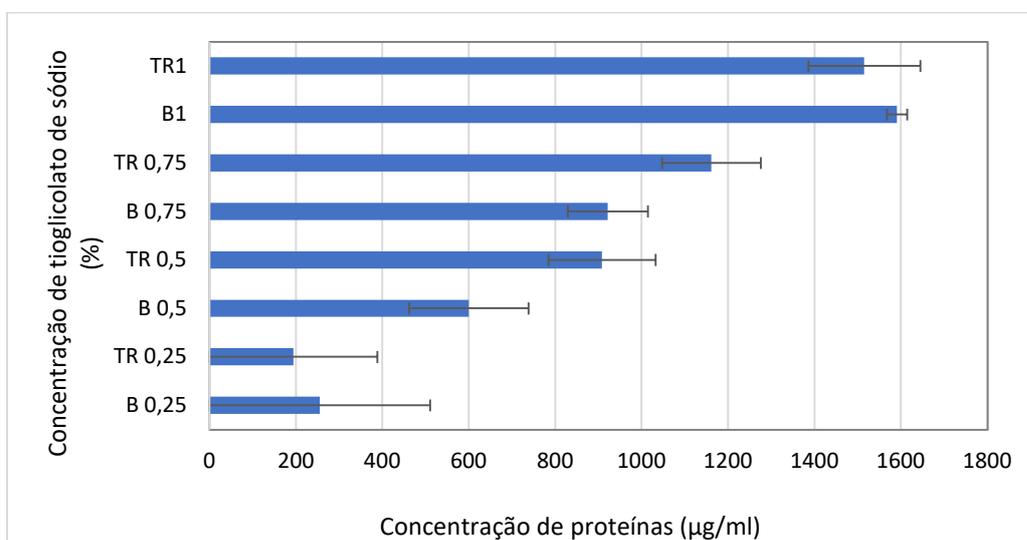


Figura 9 - Concentração de proteínas dos sobrenadantes gerados durante a degradação de penas usando a enzima P4860 com a presença de tioglicolato de sódio em 4 concentrações diferentes. TR = Tubo de reação e B = Controle com adição de TCA antes da reação.

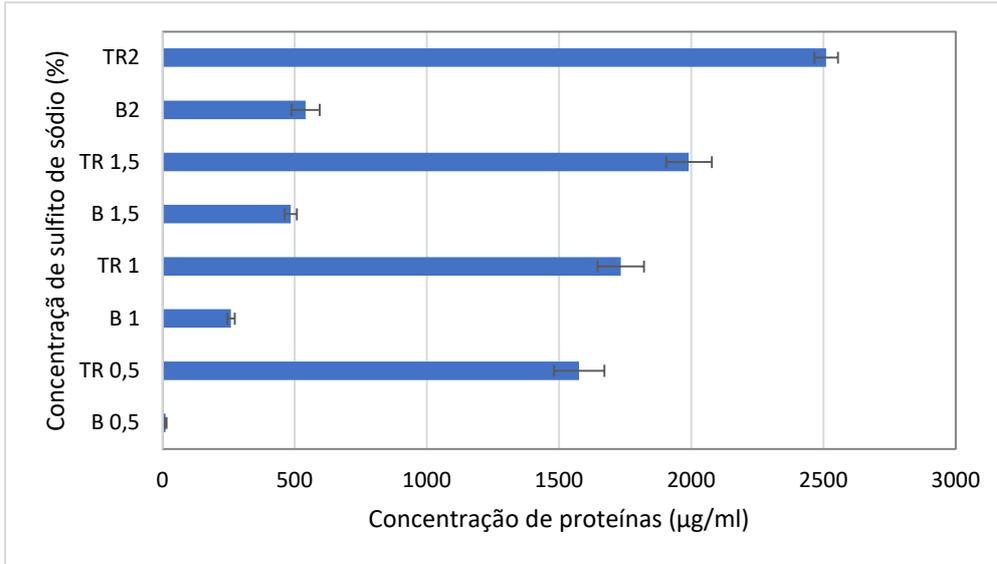


Figura 10 - Concentração de proteínas dos sobrenadantes gerados durante a degradação de penas usando a enzima P4860 na presença de cisteína em 4 concentrações diferentes. TR = Tubo de reação e B = Controle com adição de TCA antes da reação.

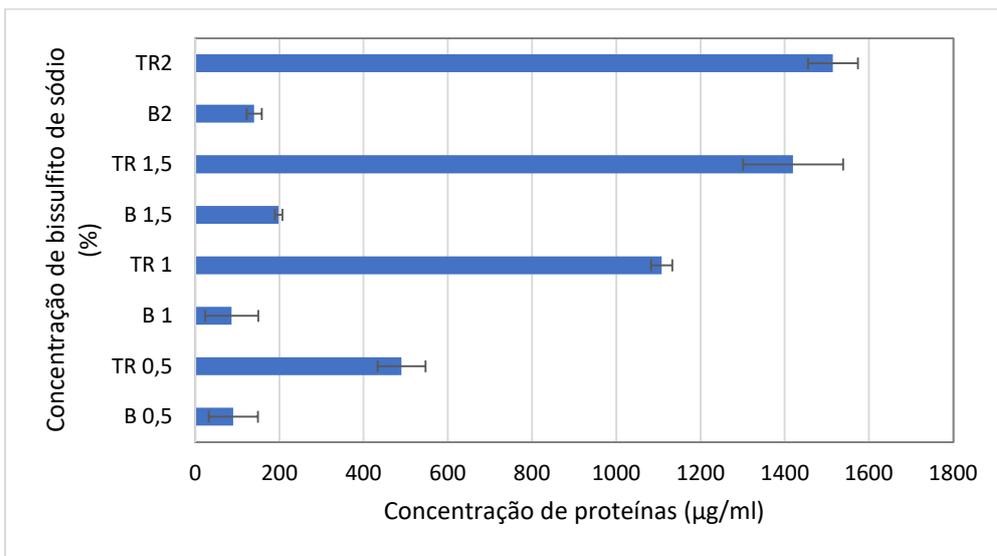


Figura 11 - Concentração de proteínas dos sobrenadantes gerados durante a degradação de penas usando a enzima P4860 na presença de bissulfito de sódio em 4 concentrações diferentes. TR = Tubo de reação e B = Controle com adição de TCA antes da reação.

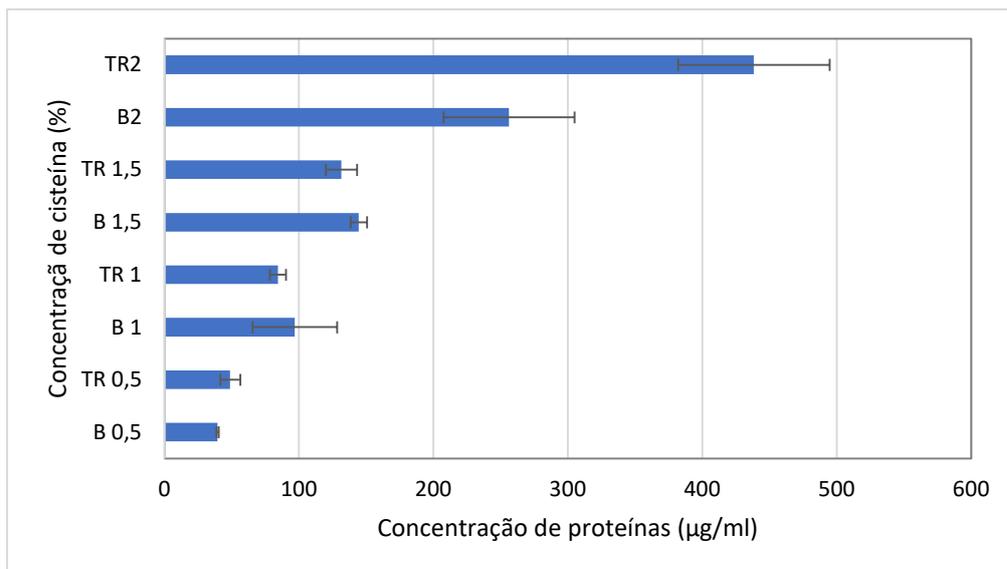


Figura 12 - Concentração de proteínas dos sobrenadantes gerados durante a degradação de penas usando a enzima P4860 na presença de cisteína em 4 concentrações diferentes. TR = Tubo de reação e B = Controle com adição de TCA antes da reação.

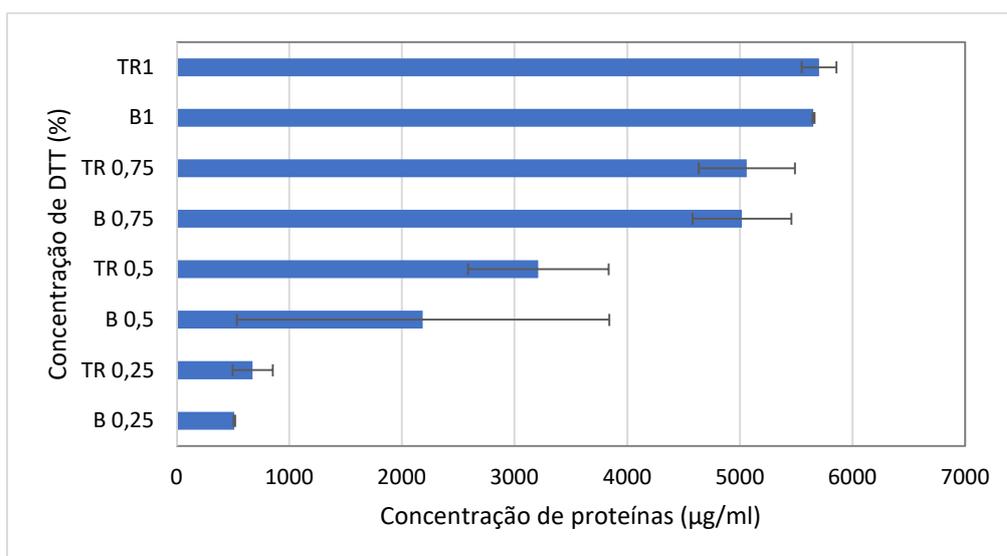


Figura 13 - Concentração de proteínas dos sobrenadantes gerados durante a degradação de penas usando a enzima P4860 na presença de DTT em 4 concentrações diferentes. TR = Tubo de reação e B = Controle com adição de TCA antes da reação.

6 DISCUSSÃO

Apenas em 2022 o Brasil registrou um abate de 6,11 bilhões de frangos no ano segundo o (IBGE 2023). A pena é uma matéria prima renovável, e várias toneladas são produzidas a cada ano. Assim, fica evidente a biodisponibilidade desse polímero que é formado majoritariamente de queratina. Segundo (Guo *et al.* 2020), atualmente, a melhoria do reaproveitamento de biomassas de origem animal, como penas, cascos e lã, tornou-se um foco da nova bioeconomia.

De acordo com Holkar (2018), a queratina apresenta uma rica reserva em proteínas e aminoácidos, no entanto essa reserva é muitas vezes inacessível pela sua característica química que a faz resistir a diferentes tipos de degradação. Assim, se torna crucial adotar metodologias que visam tornar a queratina solúvel e disponível, assim como obter proteínas e aminoácidos a partir da sua degradação. Entre os métodos mais usados para degradação da queratina estão o método de dissolução da queratina das penas usando Líquidos Iônicos, redução ou oxidação, método hidrotérmico e termoquímicos e principalmente métodos microbianos e enzimáticos, este último sendo o objetivo do estudo.

O mecanismo de hidrólise da queratina ainda não é bem elucidado, mas sabe-se que é necessário dois mecanismos, a sulfitólise e a proteólise. A sulfitólise ocorre através de enzimas redutases ou pela adição de um agente redutor, que irá clivar as ligações dissulfeto permitindo a ação das proteases. As enzimas produzidas por micro-organismos são capazes de hidrolisar diferentes biomassas existentes no planeta, e a queratina é uma delas. As penas podem ser degradadas eficientemente por vários micro-organismos, a degradação microbiana das penas é uma maneira viável e econômica de aproveitar totalmente o resíduo. Apesar dos esforços empregados nessa direção, ainda são necessários alguns trabalhos para desenvolver sistemas mais eficientes que possam ser utilizados na hidrólise da queratina. A maioria das pesquisas são focadas na utilização do caldo da cultura de células do micro-organismo de interesse, e não é focado nos componentes individuais que envolve a degradação da queratina (Navone *et al.*, 2018).

O estudo conduzido foi focado na hidrólise de penas picadas utilizando duas enzimas comerciais com ou sem a presença de um agente redutor. A enzima Sigma Aldrich P4860 de *Bacillus lincheformis*, fabricada pela Novozymes, é uma endopeptidase da família subtilisina. As subtilisinas pertencem a subtilases, um grupo de serina proteases que atuam na ligação peptídica através do resíduo de serina. São vendidas comercialmente como proteases para o

setor alimentício, sendo capaz de hidrolisar proteínas com ampla especificidade para ligações peptídicas com preferência em resíduos grandes e sem cargas.

Navone e Speight, (2018) publicou um estudo sobre a degradação enzimática de cabelo e penas usando peptidases disponíveis comercialmente e investigou os efeitos de dois agentes redutores comuns, o sulfito de sódio e o tioglicolato de sódio, os mesmos utilizados nesse trabalho, além disso, também utilizaram mesmas enzimas testada no presente trabalho, a Alcalase® LT (P4860) e a Flavourzyme® (P6110), além das enzimas Cibenza® DP100 (queratinase de *B. licheniformis* PWD-1 da Novus), Multifect® PR 6L (subtilisina de *B. licheniformis* da Dupont) e Ronozyme ProAct® (protease de *Nocardioopsis prasina* da DSM/Novozymes). O estudo de Navone e Speight (2018) mostrou que ambos os agentes redutores melhoraram significativamente a degradação enzimática da queratina utilizando as enzimas Cibenza® e Ronozyme ProAct®, ambas com atividade queratinolítica. Os autores também testaram a atividade queratinolítica da Alcalase e da Flavourzyme, e comprovaram, como nós, que ambas não são queratinase e as descartaram dos testes com os agentes redutores. O referido trabalho levanta a dúvida de que degradação das penas e cabelos poderia também ser possível com as enzimas não queratinolíticas, caso os substratos fossem tratados com os agentes redutores. Nosso trabalho responde essa questão mostrando que, com a desestruturação das queratinas pelo sulfito ou bissulfito de sódio, a Alcalase pode ser eficiente na degradação de queratina.

Experimentos do presente no nosso estudo mostraram que o tioglicolato de sódio (assim como o DTT) apresentou, independente da presença da enzima, altas concentrações de proteínas solúveis (1,68 e 2,12 mg/ml nas misturas com P6110 e P4860, respectivamente). Esses resultados são suportados por trabalhos que utilizam agentes redutores fortes para a extração e solubilização de proteínas de resíduos queratinosos (Sinkiewicz et al., 2017). Já utilizando o sulfito de sódio com a P4860, notou-se um aumento expressivo na concentração de proteínas solubilizadas, chegando a resultados máximos na concentração de 2% com cerca de 2,5 mg/ml de proteínas, enquanto a P6110 não teve resultados notáveis com o sulfito de sódio. Apesar da Alcalase não ser uma queratinase, a combinação com o sulfito de sódio gerou uma concentração muito maior de proteínas, o que corrobora com dados apresentados na literatura de que a sulfitolise é um mecanismo importante para a digestão enzimática de queratinas.

No trabalho de Navone e Speight (2018) tioglicolato de sódio (a 2%) foi mais eficaz do que o sulfito de sódio (a 1%) nas atividades das queratinases sobre cabelo, comprovado pela quantificação de peptídeos solúveis. O tioglicolato de sódio pode ser mais eficaz devido a um maior potencial redutor em relação às ligações dissulfeto em comparação com o sulfito de

sódio. No entanto, não foram realizados experimentos para confirmar essa hipótese. Nosso trabalho mostrou um resultado diferente, enquanto sulfito permitiu degradação de penas pela Alcalase (P4860), o tioglicolato parece ter inativado a enzima, mas igualmente essa hipótese não foi confirmada. Ambos os estudos mostram que o ataque inicial das ligações dissulfeto por esses agentes redutores facilita a atividade proteolítica.

No estudo conduzido por Pereira *et al.*, (2019) foi utilizada a cepa mutante de *B. subtilis* LFB-FIOCRUZ 1266 adicionando sulfito de sódio na hidrólise de penas, com resultados máximos de 4,42 mg/ml, mostrando a importância da quebra da ligação dissulfeto por esses agentes redutores. Entretanto, o trabalho de Pereira *et al.* (2019) adicionou o sulfito no sobrenadante de cultura do micro-organismo queratinolítico, mostrando que além de aumentar a degradação, este não apresentou toxicidade à bactéria.

Em relação a adição de cisteína, ela não se apresentou muito relevante na geração de proteínas solúveis, apresentando o melhor resultado de 0,5 mg/ml na maior concentração do agente químico com a enzima P4860. Enquanto o que bissulfito com a enzima P6110, apesar de ter gerado valores descartáveis de proteínas, apresentou uma melhora na atividade da enzima P4860, chegando quantificação de 1,57mg/ml de proteínas solúveis no sobrenadante de reação. A adição de DTT apresentou resultados superiores a 5 mg/ml de proteínas solubilizadas o que já era esperado devido a sua forte atividade oxidante, mas não influenciou a atividade das enzimas.

Nesse estudo foi possível observar que a presença de um agente redutor é essencial para a degradação das penas, e que proteases convencionais podem ser capazes de hidrolisar queratina na presença de um agente redutor. Contudo, é importante abordar a questão da especificidade enzima-agente redutor, concentrações, preços dos reagentes e otimização das condições de reação para elaboração de um protocolo comercialmente aplicável para a solubilização de penas como peptidases comuns.

7 CONCLUSÕES

Em vista do baixo preço e da grande disponibilidade das penas na natureza, é interessante descobrir metodologias que visam a quebra e a obtenção de suas proteínas. Este presente estudo foi focado nos componentes individuais relacionados a degradação da queratina, utilizando a combinação de diferentes proteases com a presença de diferentes agentes redutores. Alguns agentes redutores como tioglicolato e DTT foram capazes de degradar o substrato independente da adição de enzimas, entretanto são reagentes tóxicos e caros. Enquanto o sulfito de sódio e o bissulfito foram essenciais para a atividade queratinolítica da enzima Alcalase (P4860). Outros agentes redutores não apresentaram impacto significativo nas enzimas testadas, como foi o caso da cisteína. Ademais, mais ensaios devem ser conduzidos para confirmar essa hipótese, além de estudos com outras enzimas proteolíticas. No geral, os agentes redutores contribuíram para a hidrólise da queratina, o que condiz com a literatura existente. Isso foi comprovado pelo aumento expressivo na atividade da Alcalase na presença de sulfito de sódio. Outro fato importante é a necessidade de testar outras enzimas e agentes químicos em diferentes condições e concentrações, para um melhor entendimento do processo. Seria interessante obter o perfil dos hidrolisados de penas através da metodologia espectrometria de massas, para a verificação do tamanho das proteínas resultantes da degradação de penas, uma vez que é necessário saber a característica desses fragmentos para aplicações específicas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alahyaribeik, S. e Ullah, A. (2020). Methods of keratin extraction from poultry feathers and their effects on antioxidant activity of extracted keratin. *International Journal of Biological Macromolecules* 148, 449–456.
- Barber, J, Daly, J., Rutland, C., Hauber, M. e Cawthray, A. (2018) *The chicken: a natural history*. Princeton: Princeton University Press, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.2307/j.ctv3dnq3j>
- Chilakamarry, C.R., Mahmood, S., Saffe S.N.B.M., Arifin, M.A.B., Gupta, A., Sikkandar, M.Y., Begum, S.S. e Narasaiah, B. (2021). Extraction and application of keratin from natural resources: a review. *3 Biotech* 11(5), 220.
- Reddy, C.C., Khilji, I.A, Gupta, A., Bhuyar, P., Mahmood, S., AL-Japairai, H.A.S. e Chua, G.K. (2021). Valorization of keratin waste biomass and its potential applications. *Journal of Water Process Engineering* 40, 101707.
- Cheng, Z., Jia, Y., Bai, Y., Zhang, T., Ren, K., Zhou, X., Zhai, Y., Shen, X. e Hong, J. (2023). Intensifying the environmental performance of chicken meat production in China: From perspective of life cycle assessment. *Journal of Cleaner Production* 384, 135603.
- de Menezes, C.L.A., Santos, R.D.C., Santos, M.V., Boscolo, M., da Silva, R., Gomes, E. e da Silva, R.R. (2021). Industrial sustainability of microbial keratinases: production and potential applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 37(5), 86.
- De Oliveira Martinez, J.P., Cai, G., Nachtschatt, M., Navone, L., Zhang, Z., Robins, K. e Speight, R. (2020). Challenges and Opportunities in Identifying and Characterising Keratinases for Value-Added Peptide Production. *Catalysts* 10, 184.
- Da Rosa, C. (2020). Produção de peptídeos antimicrobianos por *Bacillus* sp. P45 em subprodutos da indústria avícola. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e Meio Ambiente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rio Grande do Sul, 91f.
- Duffeck, C. (2020). Prospecção de queratinases microbianas: produção e caracterização bioquímica funcional. Dissertação de mestrado em microbiologia. Universidade Estadual Paulista (Unesp), São Paulo, 57f.
- Embrapa (2024). Central de Inteligência de Aves e Suínos. Estatísticas-Portal Embrapa em 08 de fevereiro de 2024. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas>>. Acesso em: 8 fev. 2024.
- Eslahi, N., Dadashian, F. e Nejad, N.H. (2013). An investigation on keratin extraction from wool and feather waste by enzymatic hydrolysis. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 43(7), 624-48.
- FAO (2022). FAOSTAT. FAO, Rio de Janeiro, 10 abr.2023. Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/en/#home>>. Acesso em: 10 abr. 2023.
- Fontoura, R., Daroit, D.J., Corrêa, A.P.F., Moresco, K.S., Santi, L., Beys-da-Silva, W.O., Yates, J.R.3rd, Moreira, J.C.F. e Brandelli, A. (2019). Characterization of a novel antioxidant peptide from feather keratin hydrolysates. *New Biotechnology* 49, 71–76.
- Garcia, C.E.R., Youssef, E.Y., Vecchia, F.D., Pinheiro, J.W e Shimokomaki, M. (2003). Agregando valor a avicultura de postura. Anuário 2002 da Avicultura Industrial. Edição 1096, São Paulo.
- Gegeckas, A., Gudiukaitė, R., Debski, J. e Citavicius, D. (2015). Keratinous waste decomposition and peptide production by keratinase from *Geobacillus stearothermophilus* AD-11. *International Journal of Biological Macromolecules* 75, 158–165.
- Guo, L., Lu, L., Yin, M., Yang, R., Zhang, Z. e Zhao, W. (2020). Valorization of Refractory Keratinous Waste Using a New and Sustainable Bio-Catalysis. *Chemical Engineering Journal* 397, 125420–125420.
- Gupta, R., Rajput, R., Sharma, R. e Gupta, N. (2013). Biotechnological applications and prospective market of microbial keratinases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97 (23), 9931–9940.

- Gurumallesh, P., Alagu, K., Ramakrishnan, B. e Muthusamy, S. (2019). A systematic reconsideration on proteases. *International Journal of Biological Macromolecules* 128, 254–267.
- Hassan, M.A., Abol-Fotouh, D., Omer, A.M., Tamer, T.M. e Abbas, E. (2020). Comprehensive insights into microbial keratinases and their implication in various biotechnological and industrial sectors: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* 154,567–583.
- Holkar, C.R., Jain, S.S., Jadhav, A.J. e Pinjari, D.V. (2021). Valorization of keratin based waste. *Process Safety and Environmental Protection* 115, 85-98.
- IBGE (2023). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. IBGE, Rio de Janeiro 13 abr.2023. Disponível em:<<https://www.ibge.gov.br/busca.html?>>. Acesso em: 12 maio 2023.
- Idowu, A.T., Igiehon, O.O., Idowu, S. Olatunde, O. e Benjakul, S. (2020). Bioactivity Potentials and General Applications of Fish Protein Hydrolysates. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 27 (1), 109–118.
- Kacprzak, M., Malińska, K., Grosser, A., Sobik-Szołtysek, J., Wystalska, K., Drózdź, D., Jasińska, A. e Meers, E. (2023). Cycles of carbon, nitrogen and phosphorus in poultry manure management technologies – environmental aspects. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 53(8), 1–25.
- Kaewsalud, T., Yakul, K., Jantanasakulwong, K., Tapingkae, W., Watanabe, M. e Chaiyaso, T. (2020). Biochemical Characterization and Application of Thermostable-Alkaline Keratinase from *Bacillus halodurans* SW-X to Valorize Chicken Feather Wastes. *Waste and Biomass Valorization* 12 (7),3951–3964.
- Kermasha, S. e Eskin, M.N.A. (2021). Selected industrial enzymes. **Enzymes**, 259–305. Disponível em 10.1016/B978-0-12-800217-9.00009-5.
- Kshetri, P., Singh, P.L., Chanu, S.B. *et al.* (2022). Biological activity of peptides isolated from feather keratin waste through microbial and enzymatic hydrolysis. *Electronic Journal of Biotechnology* 60, 11–18.
- Kurien, Rittin Abraham; BIJU, Alan; RAJ, K. Akhil; *et al.* Chicken feather fiber reinforced composites for sustainable applications. *Materials Today: Proceedings*, 2022.
- Li, Q., Yi, L., Marek, P. e Iverson, B.L. (2013). Commercial proteases: Present and future. *FEBS Letters* 587 (8), 1155–1163.
- Li, Z., Reimer, C., Picard, M., Mohanty, A.K. e Misra, M. (2020). Characterization of Chicken Feather Biocarbon for Use in Sustainable Biocomposites. *Frontiers in Materials* 7, 3.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. e Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 267 – 275.
- Mazotto, A.M., Ascheri, J.L.R, Godoy, R.L.O., Damaso, M.C.T, Couri, S. e Vermelho, A.B. (2017). Production of feather protein hydrolyzed by *B. subtilis* AMR and its application in a blend with cornmeal by extrusion. *LWT* 84, 701–709.
- Mazotto, A.M., Couri, S., Damaso, M.C.T. e Vermelho, A.B. (2013). Degradation of feather waste by *Aspergillus niger* keratinases: Comparison of submerged and solid-state fermentation. *International Biodeterioration & Biodegradation* 85, 189–195.
- Mazotto, A.M., Cedrola, S.M.L., de Souza, E.P., Couri, S. e Vermelho, A.B. (2022). Enhanced keratinase production by *Bacillus subtilis* AMR using experimental optimization tools to obtain feather protein lysate for industrial applications. *3 Biotech* 12 (4), 90.

- MEROPS (2023). Merops Database, Rio de Janeiro 3 mai. Disponível em <<https://www.ebi.ac.uk/merops/index.shtml>>. Acesso em: 3 de maio de 2023.
- Mokrejs, P., Krejci, O. e Svoboda, P. (2011). Producing Keratin Hydrolysates from Sheep Wool. *Oriental Journal of Chemistry* 27, 4.
- Navone, L e Speight, R. (2018). Understanding the dynamics of keratin weakening and hydrolysis by proteases. *PLOS ONE* 13 (8), e0202608.
- Nnolim, N.E., Udenigwe, C.C., Okoh, A.I., Nwodo, U.U. (2020). Microbial Keratinase: Next Generation Green Catalyst and Prospective Applications. *Frontiers in Microbiology* 11, 580164.
- Peng, Z., Zhang, J., Du, G. e Chen, J. (2019). Keratin Waste Recycling Based on Microbial Degradation: Mechanisms and Prospects. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 7 (11), 9727–9736.
- Pereira de Paiva, D., Mazotto, A.M., Vermelho, A.B. e Oliveira, S.S. Keratinolytic Activity of *Bacillus Subtilis* LFB-FIOCRUZ 1266 Enhanced by Whole-Cell Mutagenesis. *3 Biotech* 9 (1), 10.
- Perța-Crișan, S., Ursachi, C. Ștefan, Gavrițaș, S., Oancea, F., & Munteanu, F.-D. (2021). Closing the Loop with Keratin-Rich Fibrous Materials. *Polymers*, 13(11), 189
- Pulidori, E., Micalizzi, S., Bramanti, E., Bernazzani, L., Duce, C., De Maria, C., Montemurro, F., Pelosi, C., De Acutis, A., Vozzi, G e Tinè, M.R (2021). *International Journal of Molecular Science*. 22, 9597.
- Qiu, J., Wilkens, C., Barrett, K. e Meyer, A.S. (2020). Microbial enzymes catalyzing keratin degradation: Classification, structure, function. *Biotechnology Advances* 44, 107607.
- Qin, X., Xu, X., Guo, Y., Shen, Q., Liu, J., Yang, C., Scott, E., Bitter, H. e Zhang, C. (2022). A sustainable and efficient recycling strategy of feather waste into keratin peptides with antimicrobial activity. *Waste Management*, 144, 421–430.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., Thomas, P.D., Huang, X., Bateman, A. e Finn, R.D. (2018). The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Research* 46, D624–D632.
- Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A. e Ashraf, M. (2019). Microbial Proteases Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 7, 110.
- Sinkiewicz, I., Śliwińska, A. e Staroszczyk, H. (2017). Alternative Methods of Preparation of Soluble Keratin from Chicken Feathers. *Waste Biomass Valor* 8, 1043–1048.
- Sinkiewicz, I., Staroszczyk, H., Śliwińska, A. (2018). Solubilization of keratins and functional properties of their isolates and hydrolysates. *Journal of Food Biochemistry*, 42 (2), e12494.
- Šafarič, R., Fras Zemljič, L., Novak, M., Dugonik, B., Bratina, B., Gubeljak, N., Bolka, S. e Strnad, S. (2020). Preparation and Characterisation of Waste Poultry Feathers Composite Fibreboards. *Materials* 13 (21), 4964.
- Sharma, S e Gupta, A (2016). Sustainable Management of Keratin Waste Biomass: Applications and Future Perspectives. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 59:1-14
- Srivastava, B., Khatri, M., Singh, G. e Arya, S.K. (2020). Microbial keratinases: An overview of biochemical characterization and its eco-friendly approach for industrial applications. *Journal of Cleaner Production* 252, 119847.
- USDA (2022). Foreign Agricultural Service, Rio de Janeiro, 12 abr 2023. Disponível em: <<https://www.fas.usda.gov/data/commodities/dairy-livestock-and-poultry>>. Acesso em 12 abr 2023.
- Verma, A., Singh, H., Anwar, S., Chattopadhyay, A., Tiwari, K.K., Kaur, S. e Dhillon, G.S. (2016) Microbial keratinases: industrial enzymes with waste management potential. *Critical Reviews in Biotechnology* 37, 476–491.

Vidmar, B. e Vodovnik, M. (2018). Microbial keratinases: enzymes with promising biotechnological applications. *Food Technology and Biotechnology* 56 (3), 312-328.

Wang, Q., Cao, Q., Wang, X., Jing, B., Kuang, H. e Zhou, L. (2013). A high-capacity carbon prepared from renewable chicken feather biopolymer for supercapacitors. *Journal of Power Sources* 225, 101–107.

Zorro, P (2018). Evaluación de diferentes cepas queratinolíticas en la hidrólisis de plumas de pollo. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia do Alimentos. Universidad Nacional de Colombia (UNAL), Bogotá, Colombia, 65f.

ANEXOS

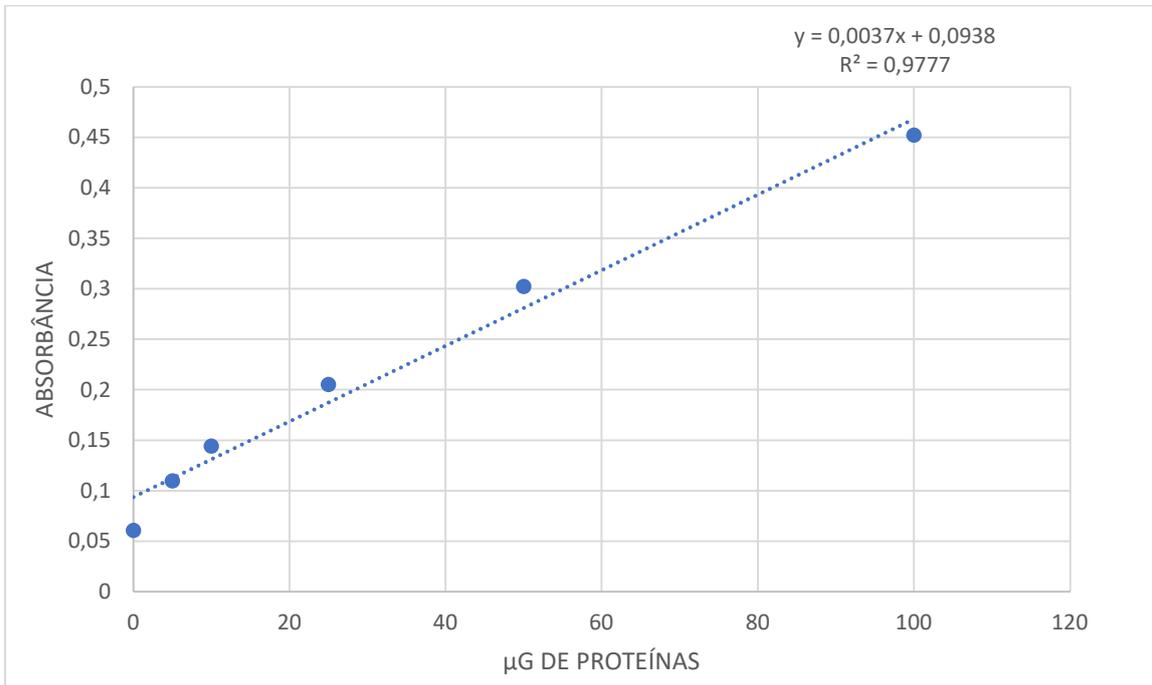


Figura A1 - Curva padrão usada para calcular a concentração de proteínas dos sobrenadantes gerados durante a degradação de penas na presença de sulfito de sódio e bissulfito de sódio.

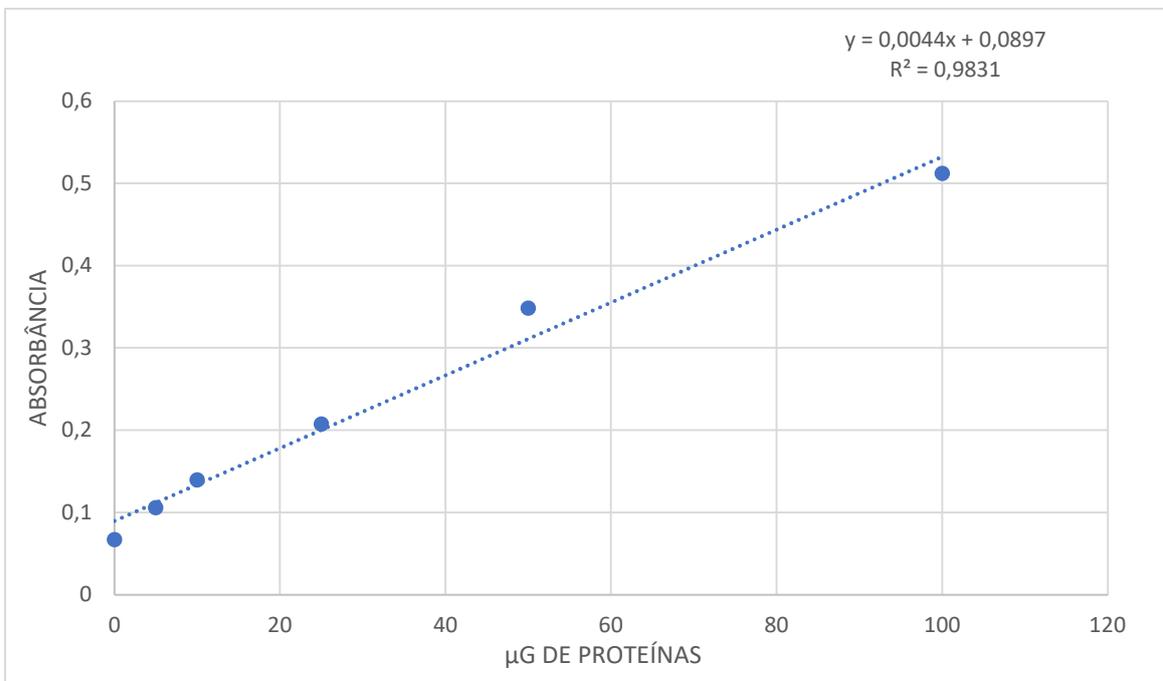


Figura A2 - Curva padrão usada para calcular a concentração de proteínas dos sobrenadantes gerados durante a degradação de penas na presença de cisteína.

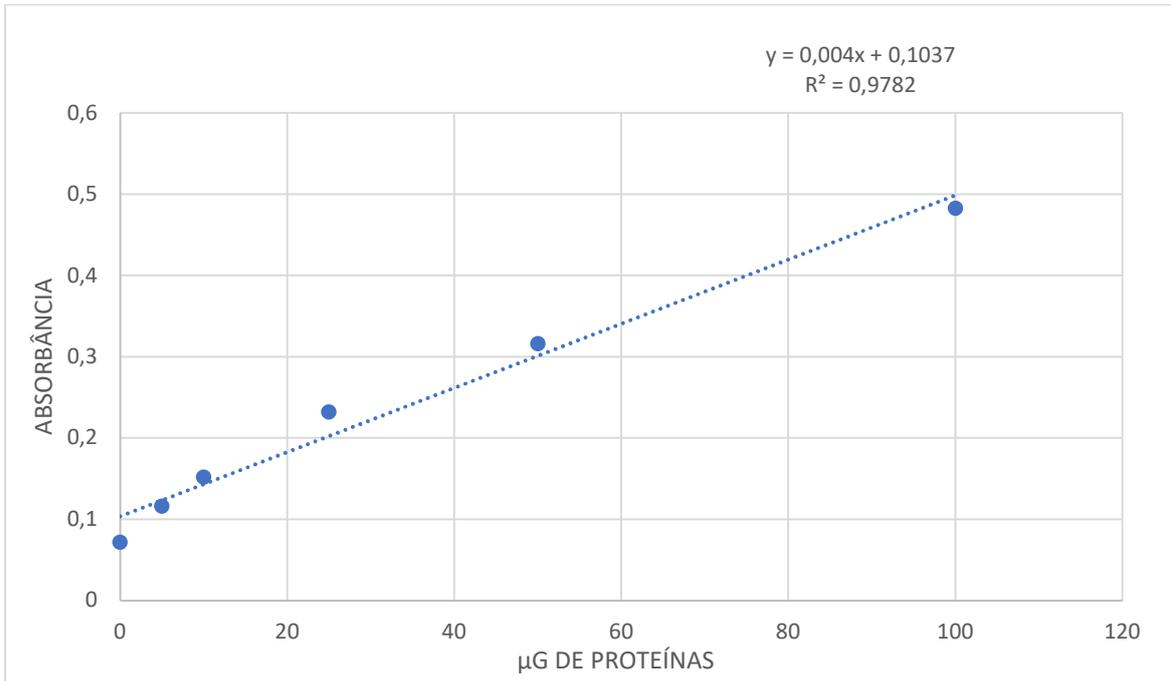


Figura A3 - Curva padrão usada para calcular a concentração de proteínas dos sobrenadantes gerados durante a degradação de penas em tubos na presença de DTT e tioglicolato de sódio.

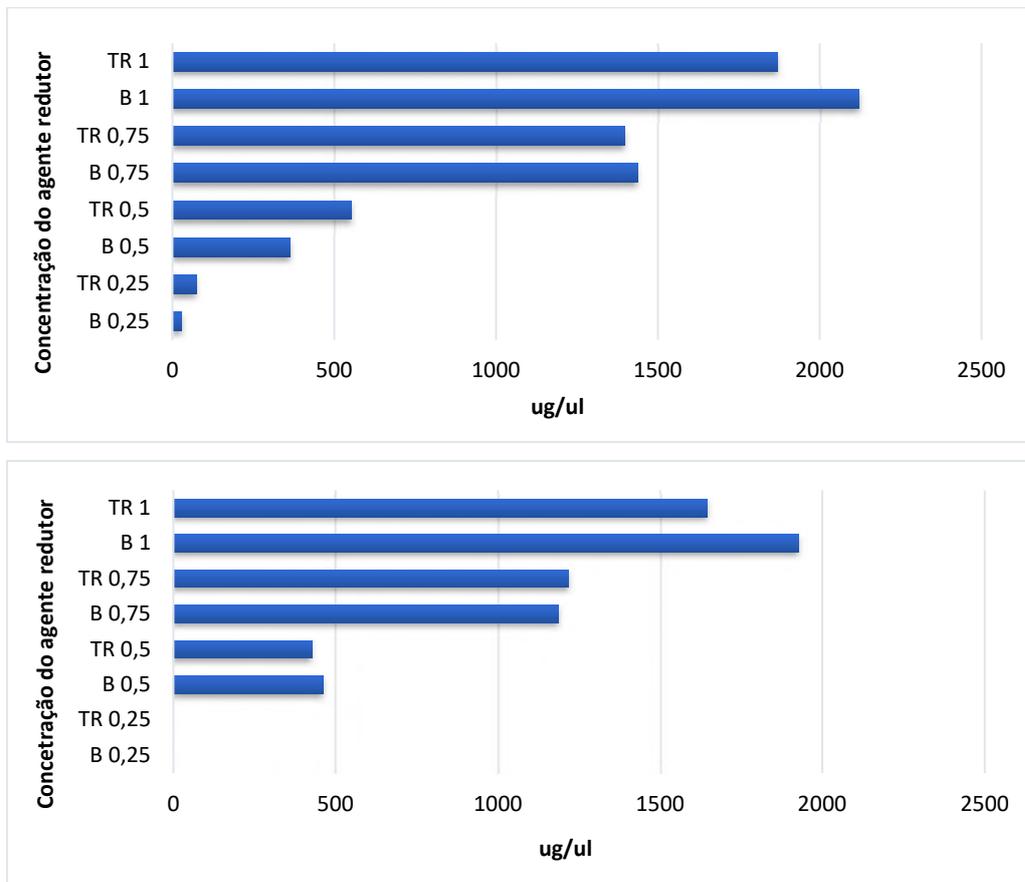
P6110 com Tioglicolato de sódio

Figura A4 - Concentração de proteínas dos sobrenadantes gerados durante a degradação de penas usando a enzima 6110 na presença de tioglicolato de sódio em 4 concentrações diferentes. TR= Tubo de reação e B= Controle com adição de TCA antes da reação.

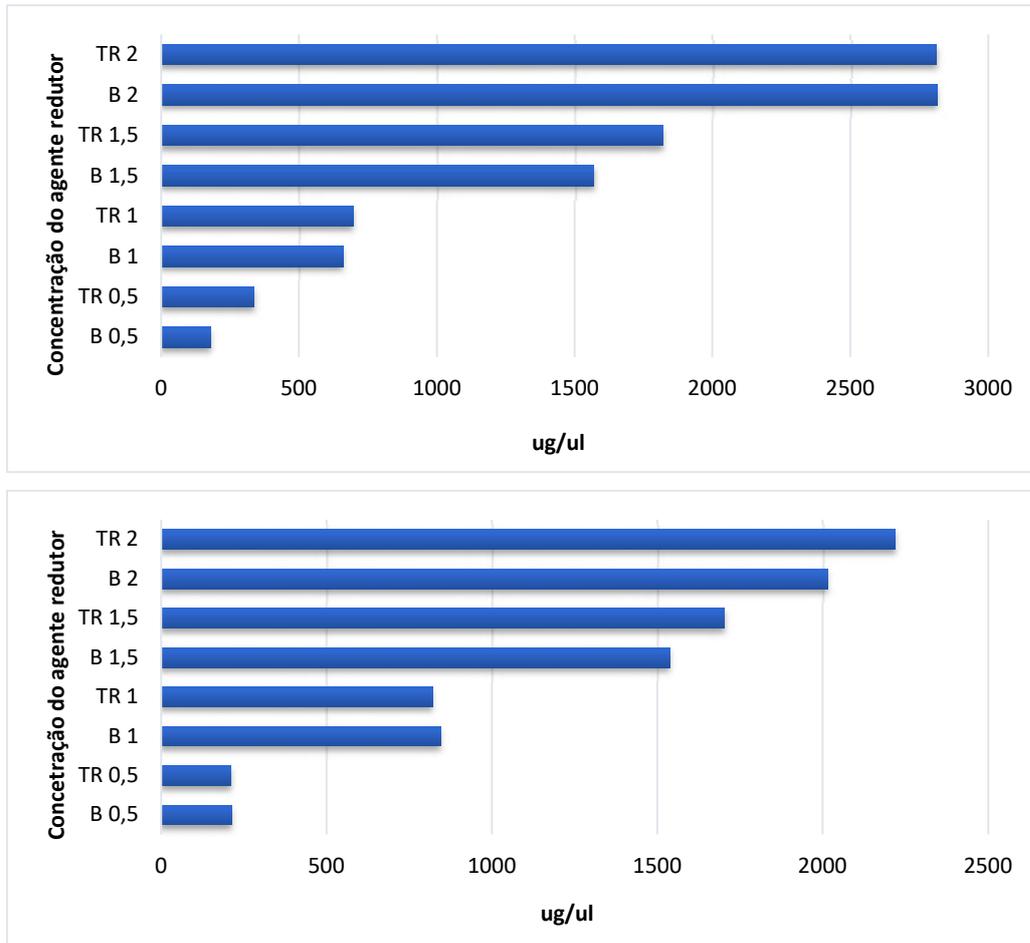
P6110 com Cisteína

Figura A5 - Concentração de proteínas dos sobrenadantes gerados durante a degradação de penas usando a enzima 6110 na presença de cisteína em diferentes concentrações. TR = Tubo de reação e B = Controle com adição de TCA antes da reação.

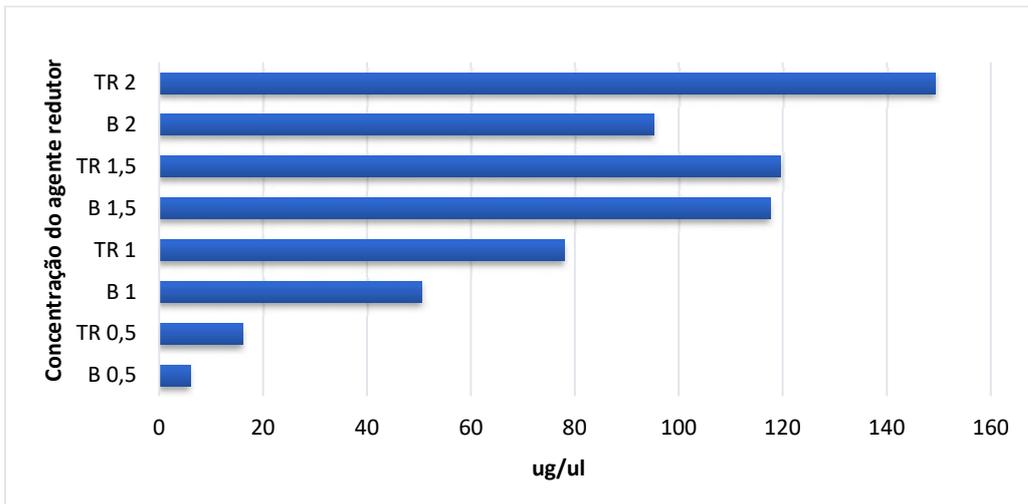
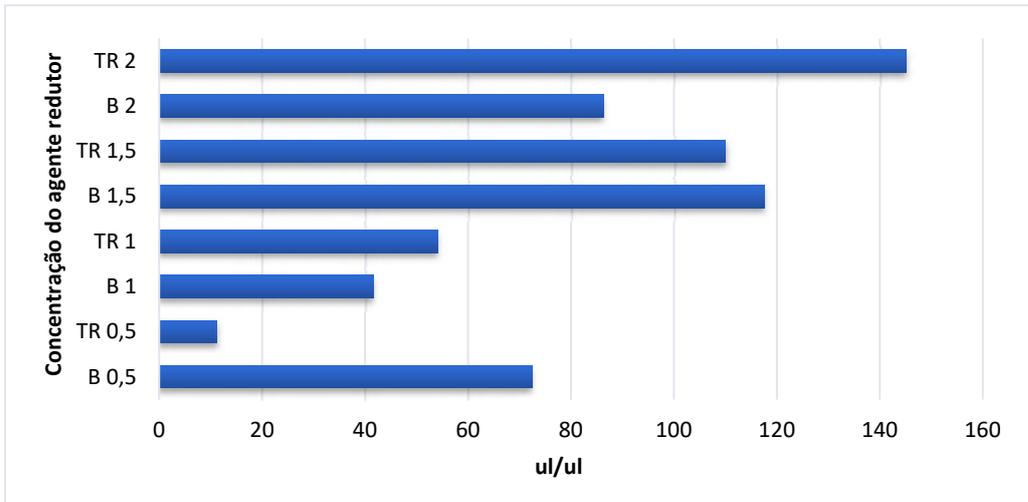
P6110 com Bissulfito

Figura A6 - Concentração de proteínas dos sobrenadantes gerados durante a degradação de penas usando a enzima P6110 na presença de bissulfito em quatro concentrações diferentes. TR = Tubo de reação e B = Controle com adição de TCA antes da reação.

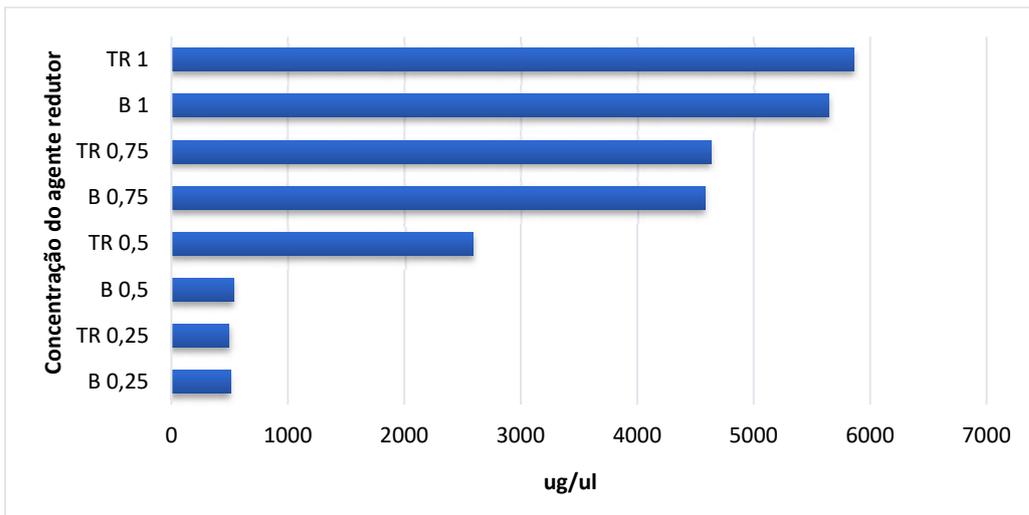
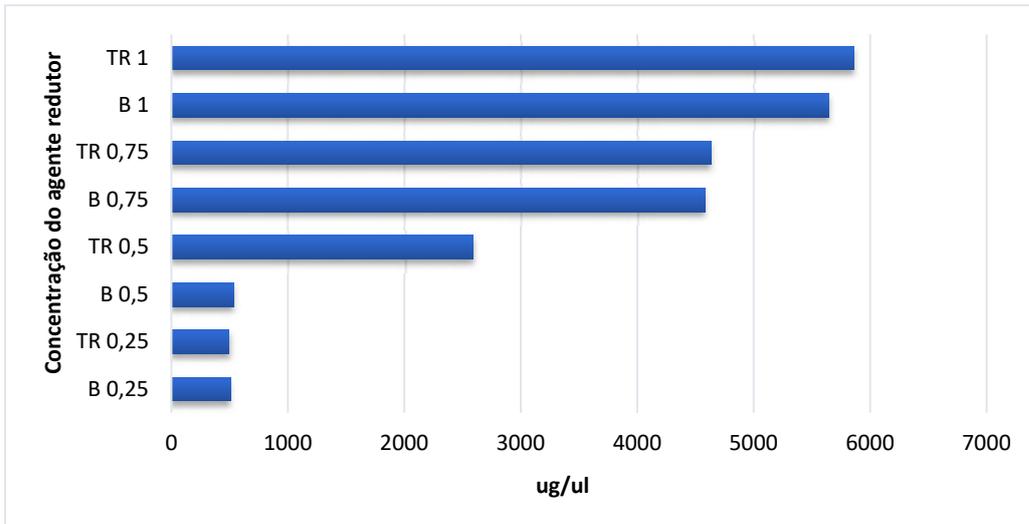
P6110 com DTT

Figura A7 - Concentração de proteínas dos sobrenadantes gerados durante a degradação de penas usando a enzima 6110 na presença de DTT em 4 concentrações diferentes. TR = Tubo de reação e B = Controle com adição de TCA antes da reação.

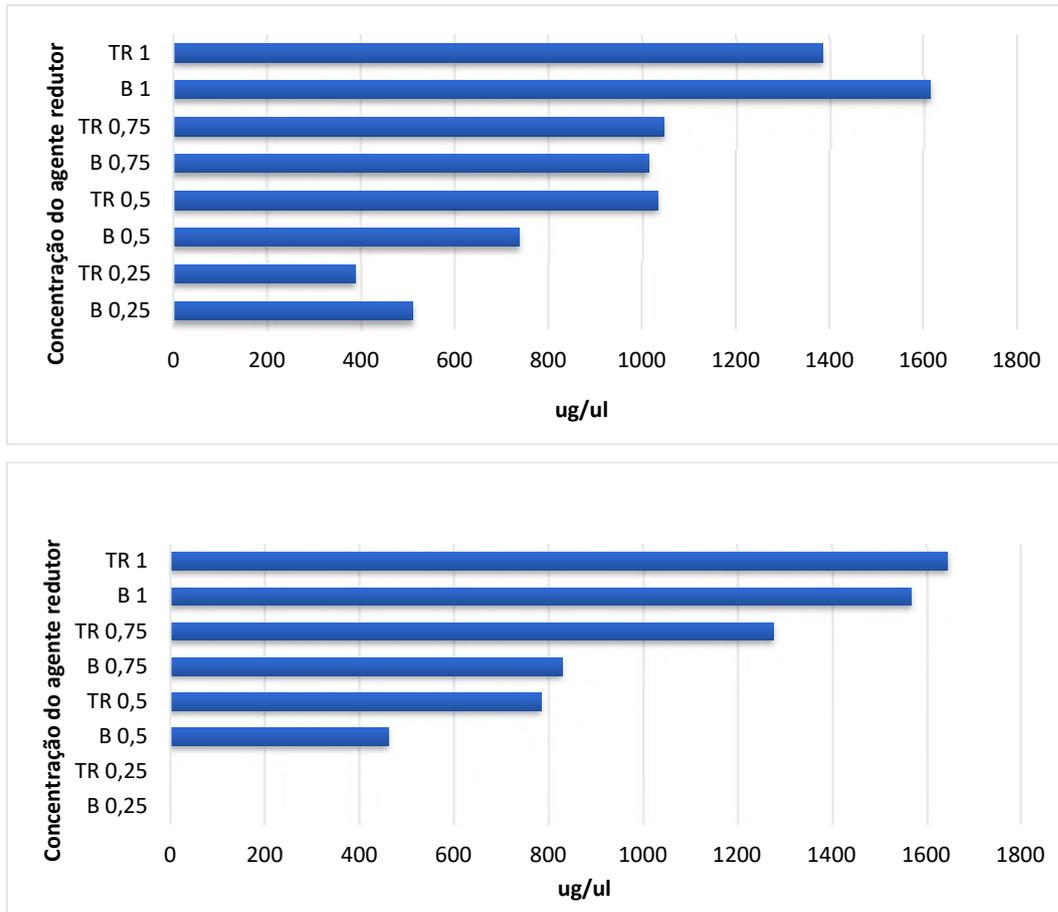
P4860 com Tioglicolato de sódio

Figura A8 - Concentração de proteínas dos sobrenadantes gerados durante a degradação de penas usando a enzima P4860 com a presença de tioglicolato de sódio em 4 concentrações diferentes. TR = Tubo de reação e B = Controle com adição de TCA antes da reação.

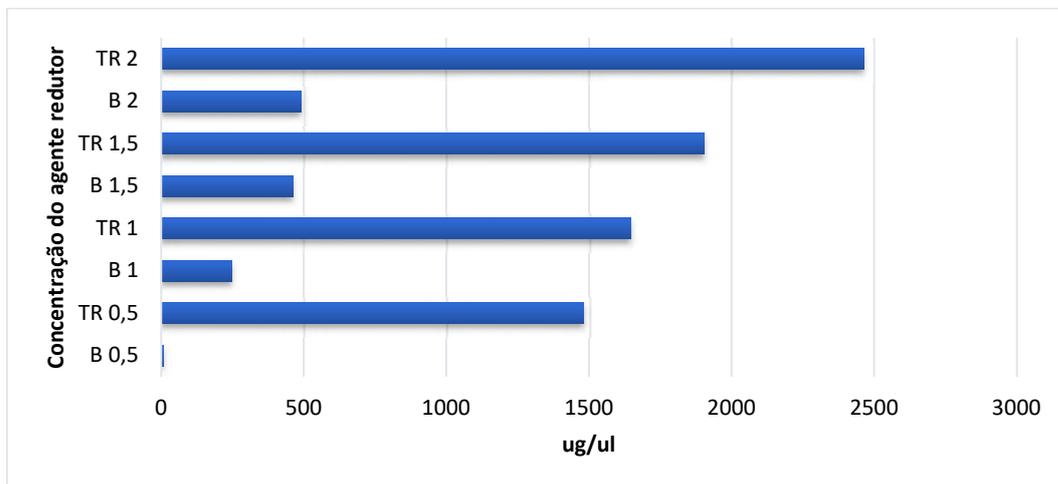
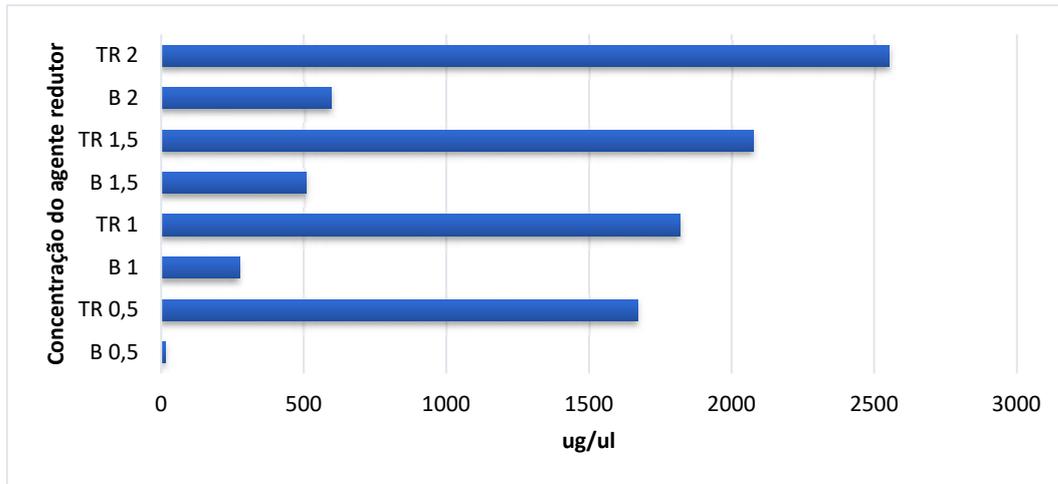
P4860 com Sulfito de sódio

Figura A9 - Gráfico da concentração de proteínas dos sobrenadantes gerados durante a degradação de penas usando a enzima P4860 com a presença de sulfito de sódio em 4 concentrações diferentes. TR= Tubo de reação e B= Controle com adição de TCA (Solubiliza proteínas na amostra).

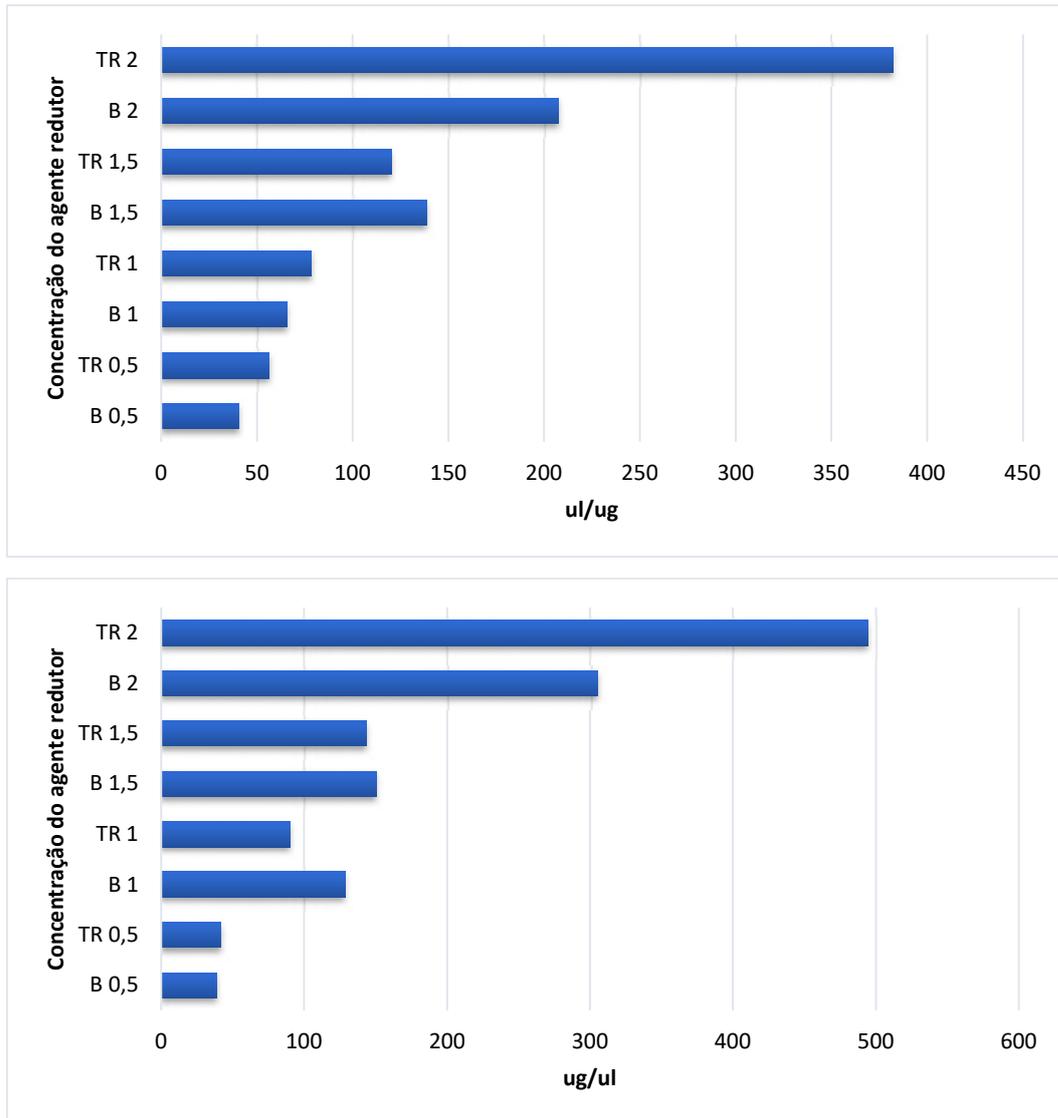
P4860 com Cisteína

Figura A10 - Concentração de proteínas dos sobrenadantes gerados durante a degradação de penas usando a enzima P4860 na presença de cisteína em 4 concentrações diferentes. TR = Tubo de reação e B = Controle com adição de TCA antes da reação.

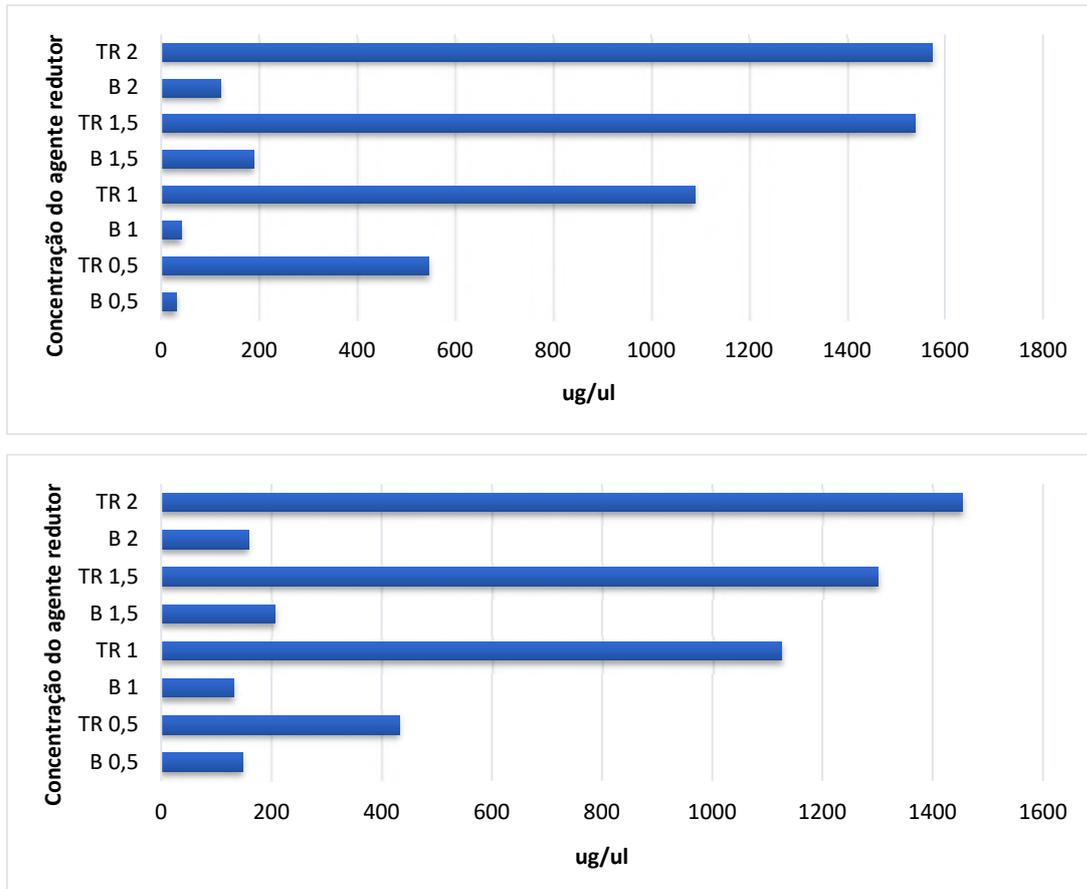
P4860 com Bissulfito

Figura A11 - Concentração de proteínas dos sobrenadantes gerados durante a degradação de penas usando a enzima P4860 na presença de bissulfito de sódio em 4 concentrações diferentes. TR = Tubo de reação e B = Controle com adição de TCA antes da reação.

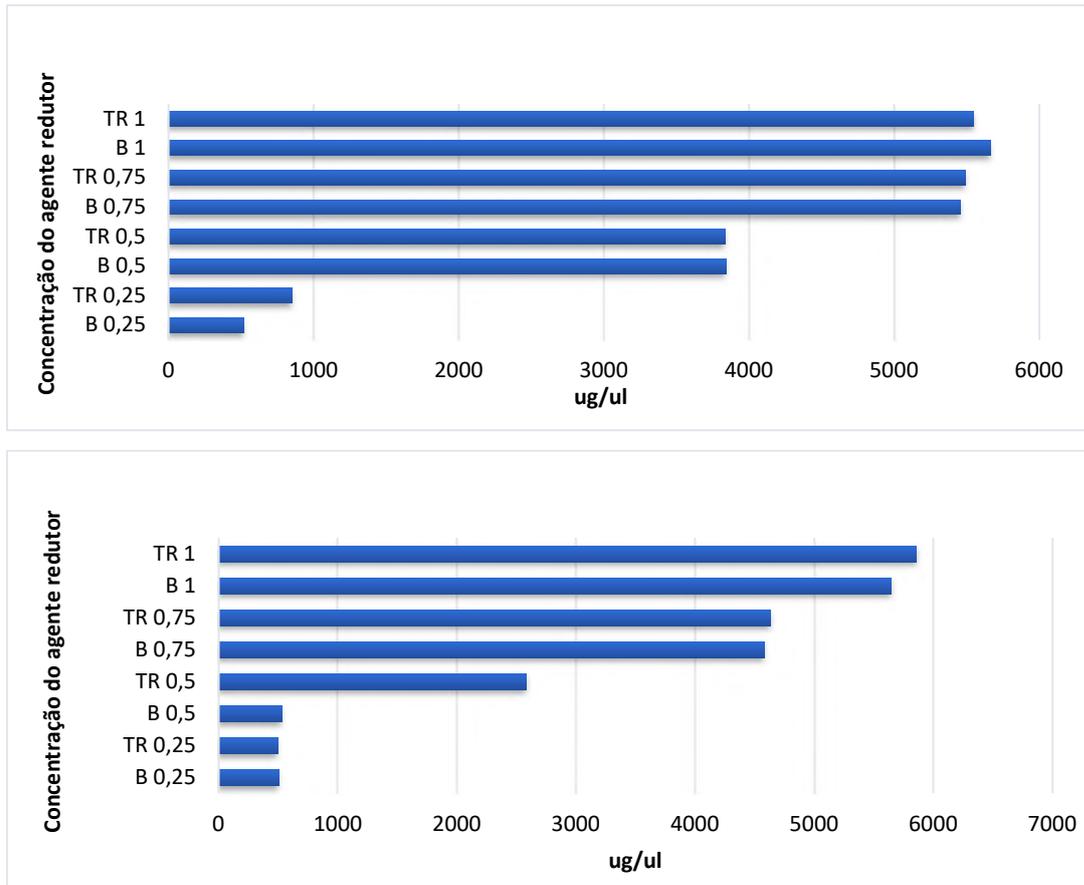
P4860 com DTT

Figura A12 - Concentração de proteínas dos sobrenadantes gerados durante a degradação de penas usando a enzima P4860 na presença de DTT em 4 concentrações diferentes. TR = Tubo de reação e B = Controle com adição de TCA antes da reação.