



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MARIANE DANIELE MUNHOZ

**EXTRAÇÃO DE ENZIMAS DE PÂNCREAS E DUODENO DE FRANGOS.
PURIFICAÇÃO PARCIAL E APLICAÇÃO DA PROTEASE**

**EXTRACTION OF ENZYMES FROM PANCREAS AND DUODENUM OF
CHICKEN. PARTIAL PURIFICATION AND APPLICATION OF PROTEASE**

**CAMPINAS
2022**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MARIANE DANIELE MUNHOZ

**EXTRAÇÃO DE ENZIMAS DE PÂNCREAS E DUODENO DE FRANGOS.
PURIFICAÇÃO PARCIAL E APLICAÇÃO DA PROTEASE**

**EXTRACTION OF ENZYMES FROM PANCREAS AND DUODENUM OF
CHICKEN. PARTIAL PURIFICATION AND APPLICATION OF PROTEASE**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Hélia Harumi Sato

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA MARIANE
DANIELE MUNHOZ, E ORIENTADA PELA
PROFA. DRA. HÉLIA HARUMI SATO

CAMPINAS

2022

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

M925e Munhoz, Mariane Daniele, 1999-
Extração de enzimas de pâncreas e duodeno de frangos. Purificação parcial e aplicação da protease / Mariane Daniele Munhoz. – Campinas, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Helia Harumi Sato.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Pâncreas. 2. Duodeno. 3. Purificação. 4. Alfa-amilases. 5. Lipase. I. Sato, Helia Harumi. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Extraction of enzymes from pancreas and duodenum of chicken. Partial purification and application of protease

Palavras-chave em inglês:

Pancreas

Duodenum

Purification

Alpha-Amylases

Lipase

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestra em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Hélia Harumi Sato

Fernanda Furlan Gonçalves Dias

Joelise de Alencar Figueira Angelotti

Data de defesa: 11-11-2022

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-1108-1988>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/2427297841315715>

COMISSÃO AVALIADORA

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato

Faculdade de Engenharia de Alimentos (UNICAMP)

Dra. Fernanda Furlan Gonçalves Dias

University of California (UC Davis)

Profa. Dra. Joelise de Alencar Figueira Angelotti

Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG)

DEDICATÓRIA

À minha mãe, minha maior inspiração e
razão do meu viver, dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, aos Orixás, a Umbanda e espíritos divinos... Por serem minha sustentação de fé.

À minha orientadora Profa Hélia Sato por toda confiança, paciência, suporte, preocupação, incentivo, apoio, ajuda em momentos difíceis, conhecimento compartilhado e compreensão durante todo esse período do mestrado.

Ao Professor Ruann de Castro por todo auxílio prestado, preocupação e cuidado com tudo e todos do Laboratório.

Aos meus queridos colegas do Laboratório de Bioquímica de Alimentos que compõem o ambiente acolhedor e agradável que temos: Carol; Vivian; Karen; Yuri; Jayme; Marcos Huann; Geodriane; Mariana; Simone; Weysser e Mayra, agradeço por todas as conversas, os cafés, suporte, receptividade, companheirismo, conhecimento compartilhado e amizade, todos os momentos foram de extrema importância durante a caminhada.

Agradeço em especial as colegas e amigas que mais aguentaram meus momentos de crise e necessidade de ajuda durante essa etapa: Fran e Gabi, obrigada por estarem ao meu lado, me apoiarem, cuidarem de mim quando precisei, me escutarem reclamar da vida, aguentarem meus momentos de desmotivação e crise devido as inseguranças quanto ao futuro, etc., vocês tornaram a caminhada mais leve e divertida, “amo’cês”.

À técnica de laboratório, Bia, pelos inúmeros momentos de conversa, conselhos, carinho, cuidado, suporte, apoio, orações, etc.

Aos meus amigos da FEAmília, primeiras amizades que fiz em Campinas e facilitaram o processo de mudar para longe de casa e da família. Obrigada por estarmos sempre juntos independente de que situação ocorra ou quão longe fisicamente estejamos.

As amizades que mais me proporcionaram recordações na vida em Campinas: Carine; Bruna Lago; Venancio e Edilaine. Obrigada por estarem presentes durante todo esse processo, serem suporte para os momentos tristes e estarem sempre dispostos para comemorar os momentos felizes. Cada “rolê aleatório” tornou mais leve os dias cinzas e proporcionou as melhores recordações que eu poderia ter.

As amizades que o vôlei me proporcionou: Sidney; Luiz Henrique; Letícia; Ayron; Andrés; Edgard; Iaci; Helena; Rachel; Dan; César; Puga e Fábio. Sou extremamente grata por cada momento de “voleizin”, momentos de estudo no IFGW, “rolês”, noites de som do vôlei, etc. Obrigada também por todo cuidado, carinho, companheirismo, por sempre acreditarem que as coisas dariam certo, serem suporte para os dias em que nem eu queria acreditar que iria

suportar, me motivarem e estarem ao meu lado. Sem vocês, talvez, eu não tivesse suportado sem surtar o primeiro semestre de 2022.

Aos amigos de Canoinhas: Bárbara; João Victor; Ariel; João Vitor e Gisela. Obrigada por sempre estarem comigo mesmo que de longe, fornecerem o apoio e carinho que preciso mesmo que a quilômetros de distância. Vocês são indispensáveis na minha vida.

Às minhas queridas Professoras da Graduação e agora amigas: Fernanda Macagnan; Joyce Borowski; Juliana Almeida; Luciana Ronsani e Priscila Nehring, as quais contribuíram com meu processo de formação profissional e pessoal, minha imensurável gratidão, por absolutamente tudo... Amizade, apoio, incentivo, conhecimento compartilhado e todas as palavras de suporte e motivação durante todo o processo de pós-graduação.

Aos meus irmãos: Maiara, Milena, Marcelo Junior e Maira; meu Pai, Marcelo; e Avós: Dionete e Eliseu, que durante todo o processo de mestrado tiveram de contar com minhas visitas de dias contados, a distância, a ausência em algumas datas comemorativas e momentos que somente o suporte que uns aos outros podemos proporcionar, peço perdão e agradeço.

À minha madrinha, Marcinha e meu tio “adotivo”, Odair, por todo suporte, amizade, carinho, preocupação, palavras de apoio, auxílio e motivação nos finais da escrita deste trabalho. Obrigada por terem sido colo quando mais precisei e por não deixarem eu desistir e/ou fraquejar. À vocês todo o meu carinho e admiração. Os dias tempestuosos também passam e a alegria surge de novo, a tristeza é somente um intervalo até a felicidade.

Por fim, agradeço a principal pessoa dessa sessão, minha Mãe, Iara Lia. A principal pessoa para todas as atividades da minha vida. Só Deus sabe o quão complexo foi escrever parte deste trabalho ao seu lado à beira de um leito de hospital, torcendo por sua plena recuperação e esperando que após a tormenta um dia você possa ler essas palavras e saber o quanto eu te admiro, o quão grata sou por todas as oportunidades que tive graças ao seu esforço para com os filhos e o tanto que eu te amo. Certamente, sem o seu colo eu não teria suportado todos os dias que pensei em desistir, te devo tudo e além. Obrigada por ser meu tudo.

À todos que de maneira direta e indireta contribuíram com o desenvolvimento do trabalho e processo do mestrado... Toda a minha gratidão.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

*“Nem os longes mais longes do mundo são intransponíveis
ao que pretende chegar.” - Pe. Fábio de Melo*

RESUMO

Entre os principais resíduos do abate de frangos tem-se destaque para as vísceras, penas e sangue que não são destinadas para consumo humano. Este estudo visou avaliar a obtenção de proteases, α -amilase e lipases de vísceras de frango. Foi estudada a extração de protease, α -amilase e lipase da preparação bruta de pâncreas e duodeno de frangos, hidrólise de proteínas, amido e óleos pelas preparações enzimáticas, purificação parcial e aplicação da protease. Foi testada a extração de enzimas por homogeneização da preparação bruta com água destilada; tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5mMol de CaCl_2 ; solução 0,9% de NaCl e tampão Tris-HCl 0,05 mMol/L pH 8,0 contendo 50mMol de CaCl_2 . Obteve-se maior extração de protease, α -amilase e lipase por homogeneização da preparação bruta de pâncreas e duodeno de frangos usando água destilada a 4°C na proporção 1:1 (m:v) e agitação manual por 5 minutos, sendo obtido valores de atividade específica de 12.888,50, 1.581,11 e 1.308,61 U/mL, respectivamente. Entre os solventes orgânicos acetona, álcool isopropílico e etanol testados para a precipitação das enzimas foi obtido melhor resultado usando acetona. Para a obtenção de preparação de proteases foi obtido melhor resultado (9.958,80 $\pm$ 73,50 U/mL e recuperação de 77,27%), por homogeneização da preparação bruta de pâncreas e duodeno de frangos com água destilada (4 °C) na proporção 1:1 (m:v) e precipitação com acetona na proporção 1:2 (v:v). Os hidrolisados de albumina de ovo obtidos com proteases de preparações enzimáticas de pâncreas e duodeno de frangos extraídas com água (4 °C) e precipitação com acetona, etanol ou álcool isopropílico apresentaram maior percentual de proteína solúvel em TCA (48,96 $\pm$ 0,08 a 49,99 $\pm$ 0,37%), comparada com os hidrolisados de caseína (35,87 $\pm$ 1,17 a 38,93 $\pm$ 1,41%) e farinha de vísceras de frangos (38,77 $\pm$ 0,42a 44,95 $\pm$ 0,91%), indicando que a albumina de ovo foi hidrolisada de forma mais eficiente que a caseína e farinha de vísceras de frangos. Na temperatura de 37°C o amido de milho apresentou menor susceptibilidade às α -amilases das preparações de pâncreas e duodeno de frangos, comparado com os amidos de mandioca, batata, amido de milho com alto teor de amilose, amido de milho ceroso e amido de arroz ceroso. As preparações enzimáticas de pâncreas e duodeno de frangos mostraram atividade de lipase similar na hidrólise de azeite de oliva, óleo de milho e óleo de soja. A protease de pâncreas e duodeno de frangos parcialmente purificada por filtração em gel Sephadex G-100 apresentou maior atividade enzimática a 54 a 56°C e pH 7,0 e estabilidade na faixa de pH 7,0 a 9,0 em temperaturas inferiores a 48°C. Os hidrolisados de proteínas de feijão fava obtidos com protease parcialmente purificada de pâncreas e duodeno de frangos apresentaram maior atividade antioxidante, estimada pelos métodos do radical DPPH e FRAP, comparado com os hidrolisados de proteínas de semente de abóbora, arroz e ervilha. As vísceras de frangos apresentam alto potencial para a obtenção de protease, α -amilase e lipase.

Palavras chaves: Pâncreas; duodeno; purificação; α -amilase; lipase.

ABSTRACT

Among the main residues from poultry slaughter, viscera, feathers and blood stand out, which are not intended for human consumption. This study aimed to evaluate the obtention of proteases, α -amylase and lipases from chicken viscera. The extraction of protease, α -amylase and lipase from the crude preparation of chicken pancreas and duodenum, hydrolysis of proteins, starch and oils by enzymatic preparations, partial purification and application of protease was studied. The extraction of enzymes by homogenization of the crude extract of pancreas and duodenum of chickens was tested with: distilled water; phosphate buffer 0.05 Mol/L pH 7.0 containing 0.5mM CaCl_2 ; 0.9% NaCl solution and Tris-HCl buffer 0.05 mMol/L pH 8.0 containing 50 mM CaCl_2 . Among the methods evaluated, the highest extraction of protease, α -amylase and lipase was obtained by homogenization of the crude extract of pancreas and duodenum of chickens using distilled water at 4°C in the proportion 1:1 (m:v) and manual agitation for 5 minutes, obtaining specific activity values of 12,888.50, 1,581.11 and 1,308.61 U/mL, respectively. Among the organic solvents acetone, isopropyl alcohol and ethanol were tested for enzyme precipitation, the best result was obtained using acetone. To obtain the preparation of proteases, the best result was obtained ($9,958.80 \pm 73.50$ U/mL and recovery of 77.27%), by homogenizing the crude extract of pancreas and duodenum of chickens with distilled water (4 °C) in proportion 1:1 (m:v) and precipitation with acetone in the proportion 1:2 (v:v). The egg albumin hydrolysates obtained with proteases from enzyme preparations of chicken pancreas and duodenum extracted with water (4 °C) and precipitation with acetone, ethanol or isopropyl alcohol showed a higher percentage of soluble protein in TCA (48.96 ± 0.08 to $49.99 \pm 0.37\%$), compared with casein hydrolysates (35.87 ± 1.17 to $38.93 \pm 1.41\%$) and chicken offal meal (38.77 ± 0.42 to $44.95 \pm 0.91\%$), indicating that egg albumin was hydrolysed more efficiently than casein and chicken viscera meal. At 37 °C, corn starch showed lower susceptibility to α -amylases from chicken pancreas and duodenum preparations, compared to cassava, potato, high amylose corn starch, waxy corn starch and waxy rice starch. Enzyme preparations from chicken pancreas and duodenum showed similar lipase activity in the hydrolysis of olive oil, corn oil and soybean oil. The chicken pancreas and duodenum protease partially purified by Sephadex G-100 gel filtration showed higher enzymatic activity at 52 to 56 °C and pH 7.0 and stability in the range of pH 7.0 to 9.0 at temperatures below 48°C. The hydrolysates of fava bean proteins obtained with protease partially purified from pancreas and duodenum of chickens showed higher antioxidant activity, estimated by the radical DPPH and FRAP methods, compared with hydrolysates of pumpkin seed, rice and pea proteins. Chicken viscera have a high potential for obtaining protease, α -amylase and lipase.

Keywords: Pancreas; duodenum; purification; α -amylase; lipase.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores codificados e reais utilizados no delineamento experimental para determinação dos efeitos do pH e temperatura na atividade e estabilidade da protease parcialmente purificada de pâncreas e duodeno de frangos	46
Tabela 2: Planejamento fatorial, valores codificados e reais das variáveis do estudo dos efeitos do pH e temperatura na estabilidade de protease parcialmente purificada de pâncreas e duodeno de frangos	47
Tabela 3: Extração de proteases da preparação bruta de pâncreas e duodeno de frangos por homogeneização em água destilada e solução tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L de CaCl₂, com agitação manual e mecânica.....	52
Tabela 4: Determinação da atividade de protease nas preparações enzimáticas obtidas por homogeneização da preparação bruta de pâncreas e duodeno de frangos em solução 0,9% de NaCl e solução tampão Tris-HCl 0,05 Mol/L pH 8,0.....	53
Tabela 5: Obtenção de protease da preparação bruta de pâncreas e duodeno de frangos por homogeneização em água destilada e solução tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L de CaCl₂, seguido de precipitação com solventes orgânicos..	55
Tabela 6: Extração de α-amilase da preparação bruta de pâncreas e duodeno de frangos por homogeneização em água destilada ou solução tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L de CaCl₂, com agitação manual e mecânica.....	57
Tabela 7: Extração de α-amilase da preparação bruta de pâncreas e duodeno de frangos por homogeneização em solução 0,9% de NaCl e solução tampão Tris-HCl 0,05 Mol/L pH 8,0 contendo 50 mMol/L de CaCl₂.....	59
Tabela 8: Extração de lipase da preparação bruta de pâncreas e duodeno de frangos por homogeneização em água destilada e em solução tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L de CaCl₂, com agitação manual e mecânica.....	60
Tabela 9: Extração de lipase da preparação bruta de pâncreas e duodeno de frangos por homogeneização em solução 0,9% de NaCl e em solução tampão Tris-HCl 0,05 Mol/L pH 8,0 contendo 50 mMol/L de CaCl₂	62

Tabela 10: Hidrólise de proteínas com proteases de preparações enzimáticas de pâncreas e duodeno de frangos, estimada pela concentração de proteína solúvel em ácido tricloroacético	64
Tabela 11: Hidrólise de amido a 37 °C pela α-amilase de preparações enzimáticas de pâncreas e duodeno de frangos e formação de açúcares redutores.....	67
Tabela 12: Hidrólise de amido a 50 °C pela α-amilase de preparações enzimáticas de pâncreas e duodeno de frangos e formação de açúcares redutores.....	68
Tabela 13: Hidrólise de azeite de oliva, óleo de milho e soja com lipase de preparações enzimáticas de pâncreas e duodeno de frangos	69
Tabela 14: Purificação de protease de pâncreas e duodeno de frangos	71
Tabela 15: Atividade de hidrólise de proteínas da protease parcialmente purificada de pâncreas e duodeno de frangos e proteases comerciais, estimada pela determinação de proteína solúvel em TCA	74
Tabela 16: Matriz do planejamento experimental para estudo dos efeitos do pH e temperatura na atividade da protease parcialmente purificada de pâncreas e duodeno de frangos .	75
Tabela 17: Coeficiente de regressão, erro padrão, valor-t e p-valor do estudo dos efeitos das variáveis pH e temperatura na atividade de protease parcialmente purificada de pâncreas e duodeno de frangos	76
Tabela 18: Matriz do planejamento experimental para estudo dos efeitos do pH e temperatura na estabilidade da protease parcialmente purificada de pâncreas e duodeno de frangos	78
Tabela 19: Coeficiente de regressão, erro padrão, valor-t e p-valor do estudo dos efeitos das variáveis pH e temperatura na estabilidade da protease parcialmente purificada de pâncreas e duodeno de frangos	80
Tabela 20: Concentração de proteína solúvel em ácido tricloroacético dos hidrolisados de proteínas de semente de abóbora, arroz, ervilha, feijão fava obtidos com preparações de proteases de pâncreas e duodeno de frangos	82

Tabela 21: Atividade antioxidante estimada pelo método de DPPH dos hidrolisados de proteínas de semente de abóbora, arroz, ervilha e feijão fava obtidos com preparações de proteases de pâncreas e duodeno de frangos.....	84
--	-----------

Tabela 22: Atividade antioxidante estimada pelo método FRAP dos hidrolisados de proteínas de semente de abóbora, arroz, ervilha e feijão fava obtidos com preparações de proteases de pâncreas e duodeno de frangos	85
--	-----------

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema sistema digestório dos frangos	22
Figura 2: Análise de tendências de palavras-chave de publicações científicas sobre obtenção de enzimas pancreáticas de frangos nos bancos de dados Web of Science Core Collection e Scopus.	26
Figura 3: Fluxograma de análises.....	41
Figura 4: Purificação da protease da preparação enzimática de pâncreas e duodeno de frangos em coluna de Sephadex G-100	71
Figura 5: Curva de contorno e superfícies de resposta dos efeitos do pH e temperatura na atividade da protease parcialmente purificada de pâncreas e duodeno de frangos.....	76
Figura 6: Gráficos dos efeitos do pH e temperatura na estabilidade da protease parcialmente purificada de pâncreas e duodeno de frangos.....	79
Figura 7: Curva de contorno e superfícies de resposta dos efeitos do pH e temperatura na estabilidade da protease parcialmente purificada de pâncreas e duodeno de frangos .	81

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo Geral.....	21
2.2 Objetivos Específicos	21
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1 Frangos - Fisiologia e trato gastrointestinal	22
3.2 Produção e consumo de carne de frango	24
3.3 Subprodutos do abate de frangos	24
3.4 Obtenção e purificação de proteases, lipases e α-amilases de vísceras de frangos ...	24
3.5 Aplicação potencial de proteases, lipases e α-amilases de origem animal	35
3.5.1 Obtenção de hidrolisados proteicos com atividade antioxidante	36
4. MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 Coleta das vísceras de frangos	39
4.2 Obtenção da preparação bruta de pâncreas e duodeno de frangos	39
4.3 Obtenção das preparações enzimáticas de protease, α-amilase e lipase da preparação bruta de pâncreas e duodeno de frangos	39
4.3.1 Obtenção de preparações enzimáticas por homogeneização da preparação bruta de pâncreas e duodeno em água destilada ou solução tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5mM de CaCl₂.....	39
4.3.2 Obtenção de preparações enzimáticas por homogeneização da preparação bruta de pâncreas e duodeno em solução 0,9% de NaCl e Tampão Tris-HCl 0,05 Mol/L pH 8,0	

contendo 50 mMol/L de CaCl ₂	40
4.3.3 Obtenção de preparações enzimáticas da preparação bruta de pâncreas e duodeno por extração em água destilada ou solução tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L de CaCl ₂ , seguido de precipitação com solventes orgânicos: acetona, etanol ou álcool isopropílico.....	40
4.4 Determinação da atividade enzimática de protease, α -amilase e lipase.....	42
4.4.1 Determinação da atividade enzimática de protease.....	42
4.4.2 Determinação da atividade enzimática de α -amilase.....	42
4.4.3 Determinação da atividade enzimática de lipase	42
4.5 Determinação da concentração de proteína	43
4.6 Hidrólise de proteínas, amido e óleos vegetais com preparações enzimáticas de pâncreas e duodeno de frangos.....	43
4.6.1 Hidrólise de proteínas com preparações enzimáticas de pâncreas e duodeno de frangos.....	43
4.6.1.1 Determinação do teor de proteína solúvel em ácido tricloroacético, nos hidrolisados proteicos	43
4.6.2 Hidrólise de amido com preparações enzimáticas de pâncreas e duodeno de frangos	44
4.6.3. Hidrólise de óleos com preparações enzimáticas de pâncreas e duodeno de frangos	44
4.7. Purificação parcial da protease de pâncreas e duodeno de frangos por filtração em gel de Sephadex G-100.....	45
4.7.1 Determinação da atividade da protease parcialmente purificada de pâncreas e duodeno de frangos e preparações de enzimas comerciais em diferentes proteínas	45
4.7.2 Determinação do efeito do pH e temperatura na atividade e estabilidade da protease	

parcialmente purificada de pâncreas e duodeno de frangos utilizando planejamento experimental.....	45
4.7.2.1 Determinação dos efeitos do pH e temperatura na atividade da protease parcialmente purificada de pâncreas e duodeno de frangos, utilizando planejamento experimental	45
4.7.2.2.Determinação dos efeitos do pH e temperatura na estabilidade da protease parcialmente purificada de pâncreas e duodeno de frangos, utilizando planejamento experimental	46
4.8 Estudo da aplicação das preparações de proteases de pâncreas e duodeno de frangos	47
4.8.1 Obtenção de hidrolisados de proteínas de arroz, ervilha, feijão fava e semente de abóbora utilizando preparações de proteases de pâncreas e duodeno de frangos....	47
4.8.1.1 Determinação das proteínas solúveis em ácido tricloroacético dos hidrolisados de proteínas de arroz, ervilha, feijão fava e semente de abóbora obtidos com preparações de proteases de pâncreas e duodeno de frangos	48
4.8.1.2 Avaliação da atividade antioxidante dos hidrolisados de proteínas de arroz, ervilha, feijão fava e semente de abóbora obtidos com preparações de proteases de pâncreas e duodeno de frangos	48
4.8.1.2.1 Avaliação da atividade antioxidante dos hidrolisados de proteínas de arroz, ervilha, feijão fava e semente de abóbora obtidos com preparações de proteases de pâncreas e duodeno de frangos pelo método de DPPH.....	48
4.8.1.2.2 Avaliação da atividade antioxidante dos hidrolisados de proteínas de arroz, ervilha, feijão fava e semente de abóbora obtidos com preparações de proteases de pâncreas e duodeno de frangos pelo ensaio FRAP: Método de redução de ferro .	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1 Extração de protease, α -amilase e lipase da preparação bruta de pâncreas e duodeno de frangos.....	50

5.1.1 Extração de proteases por homogeneização da preparação bruta de pâncreas e duodeno de frangos em água destilada e solução tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L de CaCl ₂	50
5.1.2 Extração de protease por homogeneização da preparação bruta de pâncreas e duodeno de frangos em solução 0,9% de NaCl e solução tampão Tris-HCl 0,05 Mol/L pH 8,0	53
5.1.3 Obtenção de proteases por homogeneização da preparação bruta de pâncreas e duodeno de frangos em água destilada ou homogeneização em solução tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L de CaCl ₂ , seguido por precipitação com solventes orgânicos.....	54
5.1.4 Extração de α -amilase por homogeneização da preparação bruta de pâncreas e duodeno de frangos em água destilada ou solução tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L de CaCl ₂	56
5.1.5 Extração de α -amilase por homogeneização da preparação bruta de pâncreas e duodeno de frangos em solução 0,9% de NaCl e solução tampão Tris-HCl 0,05 Mol/L pH 8,0 contendo 50 mMol/L de CaCl ₂	57
5.1.6 Extração de lipase por homogeneização da preparação bruta de pâncreas e duodeno de frangos em água destilada e solução tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L de CaCl ₂	59
5.1.7 Extração de lipase da preparação bruta de pâncreas e duodeno de frangos por homogeneização em solução 0,9% de NaCl e solução tampão Tris-HCl 0,05 Mol/L pH 8,0 contendo 50 mMol/L de CaCl ₂	61
5.2 Hidrólise de proteínas, amido e óleos vegetais com preparações enzimáticas de pâncreas e duodeno de frangos.....	62
5.2.1 Hidrólise de proteínas com proteases de preparações enzimáticas de pâncreas e duodeno de frangos	62
5.2.2 Hidrólise de amido pela α -amilase de preparações enzimáticas de pâncreas e	

duodeno de frangos	65
5.2.3 Hidrólise de azeite de oliva, óleo de milho e soja com lipase de preparações enzimáticas de pâncreas e duodeno de frangos.....	69
5.3 Purificação parcial da protease de pâncreas e duodeno de frangos por filtração em gel de Sephadex G-100.....	70
5.3.1 Atividade de hidrólise de proteínas da protease parcialmente purificada de pâncreas e duodeno de frangos.....	72
5.3.2 Efeito do pH e temperatura na atividade e estabilidade da protease parcialmente purificada de pâncreas e duodeno de frangos	74
5.3.2.1 Efeitos do pH e temperatura na atividade da protease parcialmente purificada, utilizando planejamento experimental.....	74
5.3.2.2 Efeitos do pH e temperatura na estabilidade da protease parcialmente purificada de pâncreas e duodeno de frangos, utilizando planejamento experimental	77
5.4 Aplicação das preparações de proteases de pâncreas e duodeno de frangos	82
5.4.1 Obtenção de hidrolisados de proteínas de arroz, ervilha, feijão fava e semente de abóbora utilizando preparações de proteases de pâncreas e duodeno de frangos....	82
5.4.1.1 Teor de proteína solúvel em ácido tricloroacético dos hidrolisados de proteínas de arroz, ervilha, feijão fava e semente de abóbora	82
5.4.1.2 Atividade antioxidante dos hidrolisados de proteínas de arroz, ervilha, feijão e semente de abóbora obtidos com protease de pâncreas e duodeno de frangos	83
5.4.1.2.1 Capacidade de eliminação de radical DPPH.....	83
5.4.1.2.2 Capacidade antioxidante redutor férrico (FRAP).....	84
6 CONCLUSÃO.....	88
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

1. INTRODUÇÃO

Estima-se que ao final do abate de aves são gerados aproximadamente 37% do peso vivo do animal de resíduos não destinados ao consumo humano (Associação Brasileira de Reciclagem Animal, 2016). O resíduo do abate de aves é composto por 16% de vísceras, 9% penas e 3% sangue, do percentual total do peso do animal vivo, sendo que 9% é composto por cabeça, crista, barbela, ossos, pele, aparas de carne, pé e tecidos adiposos.

De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2022), a produção mundial aproximada de frangos de corte no ano de 2021 foi de 101 milhões de toneladas, sendo que o Brasil ocupa a terceira posição no ranking de produtores. Desse montante produzido, foram gerados aproximadamente 28,3 milhões de toneladas de resíduos provenientes do abate de aves, sendo que 16,2 milhões de toneladas são representadas apenas pelas vísceras de frangos.

Os resíduos de abate de frangos são utilizados para fabricação de farinhas de origem animal. As vísceras são geralmente fritas para a obtenção de farinha de vísceras de frangos, enquanto que as penas de aves são cozidas em alta pressão e temperatura para a obtenção de farinha de penas. O sangue de aves sofre processo de coagulação e secagem a alta temperatura para a obtenção de farinha de sangue. Essas farinhas ou misturas são usadas em ração para animais.

O descarte inapropriado dos resíduos gerados do abate pode acarretar na poluição ambiental, doenças e até mesmo na perda de recursos biológicos como proteínas, enzimas e lipídeos. O estudo de métodos que promovam um melhor aproveitamento dos recursos biológicos para a geração de produtos de maior valor agregado pode evitar o descarte inadequado e posteriormente reduzir consideravelmente o impacto gerado por esses resíduos (LASEKAN *et al.*, 2013)

Grande parte das pesquisas que visam a recuperação de recursos biológicos a partir de resíduos provenientes do abate de animais tem seu foco voltado no aproveitamento de resíduos de peixes (VISESSANGUAN, 2000; GILDBERG, 2004; BEZERRA *et al.*, 2005; BHASKAR *et al.*, 2007; HARNEDY; FITZGERALD, 2012). O número de pesquisas sobre recuperação de moléculas bioativas de alto valor agregado a partir de resíduos de outras espécies é consideravelmente maior se comparado com o aproveitamento de resíduos provenientes do abate de aves (RATHINA RAJ *et al.*, 2010a, b; LASEKAN *et al.*, 2013).

Dentre os resíduos provenientes do abate de frangos, as vísceras possuem o maior conteúdo de proteases endógenas. Essas enzimas concentram-se no pâncreas e na mucosa do

intestino delgado, na região do duodeno e jejuno, sendo que essas proteases consistem principalmente de aminopeptidases e serina proteases como a tripsina e a quimotripsina (MAHAGNA *et al.*, 1995; GUYONNET *et al.*, 1999; ZHAO *et al.*, 2007; JAMDAR & HARIKUMAR, 2005; DAMLE *et al.*, 2010b). Além das proteases, o pâncreas e o intestino de frangos também possuem teores consideráveis de amilases e lipases. De acordo com Osman (1982) a atividade de amilases do pâncreas e intestino de frangos é maior quando comparada com as amilases de pâncreas de bovinos, camelos e suínos (DAHLQVIST, 1961; OSMAN & EL KHATIM, 1981; SIDDONS, 1968).

Nesse sentido, o presente projeto visou a obtenção de preparações enzimáticas contendo protease, α -amilase e lipase, de pâncreas e duodeno de frangos testando diferentes soluções e métodos de extração, determinação da atividade enzimática das preparações e aplicação na hidrólise de diferentes proteínas, fontes de amido e óleos. Purificação parcial, caracterização e aplicação da protease de pâncreas e duodeno de frangos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente estudo teve por objetivo a obtenção de preparações enzimáticas contendo protease, α -amilase e lipase, de pâncreas e duodeno de frangos (*Gallus gallus*) utilizando diferentes soluções e métodos de extração, determinação da atividade enzimática das preparações e aplicação na hidrólise de diferentes proteínas, fontes de amido e óleos. Purificação parcial, caracterização e aplicação da protease de pâncreas e duodeno de frangos.

2.2 Objetivos Específicos

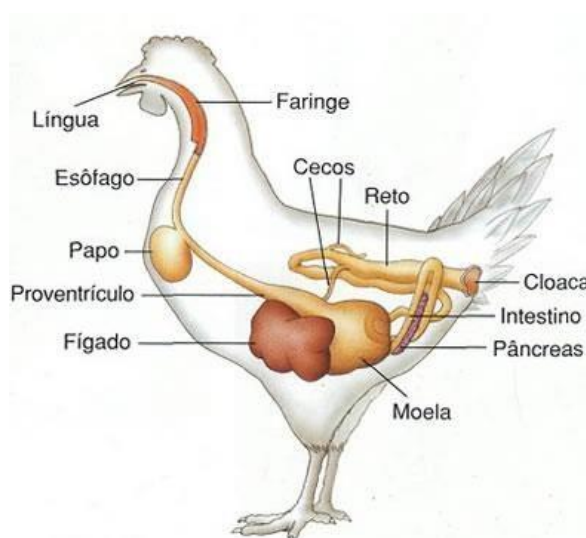
- Obtenção de preparações enzimáticas de protease, α -amilase e lipase a partir de pâncreas e duodeno de frangos por diferentes métodos de extração;
- Estudo da hidrólise de diferentes proteínas, fontes de amido e óleos pelas preparações enzimáticas de pâncreas e duodeno de frangos;
- Purificação parcial da protease de pâncreas e duodeno de frangos;
- Avaliação do efeito do pH e da temperatura na atividade e estabilidade da protease parcialmente purificada;
- Comparação da atividade da protease parcialmente purificada de pâncreas e duodeno de frangos em relação às proteases comerciais;
- Hidrólise das proteínas de arroz, ervilha, feijão fava e semente de abóbora com a protease parcialmente purificada e determinação da atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Frangos - Fisiologia e trato gastrointestinal

Os frangos (*Gallus gallus*) possuem temperatura corporal variável entre 41 e 42 °C. Possuem o trato gastrointestinal composto por um tubo contínuo, constituído pela boca, esôfago, papo (pH 5,5), proventrículo (pH 2,5- 3,5), ventrículo ou moela (pH 5-6), intestino delgado (duodeno pH 5-6, jejuno pH 6,5- 7,5 e íleo pH 7-7,5), intestino grosso (ceco pH 6,9, cólon, reto pH 7-8) e cloaca pH 8.

Figura 1: Esquema sistema digestório dos frangos



Fonte: PrePara Enem, 2022.

O bico das aves tem a função de apreensão dos alimentos. Na boca está presente a língua e poucas papilas gustativas. O esôfago das aves é bem elástico e apresenta glândulas secretoras de muco para lubrificação. O papo apresenta a mesma estrutura do esôfago, porém é uma região mais dilatada para armazenamento dos alimentos. O estômago das aves apresenta duas porções; proventrículo com função glandular e moela com função mecânica. No proventrículo existem glândulas tubulares secretoras de muco e glândulas gástricas secretoras de HCl e pepsina. A moela realiza a moagem e homogeneização do alimento com HCl e pepsina (BOSC-BIERNE *et al.*, 1984). Quando o alimento ingerido alcança o trato gastrointestinal ocorrem diversos eventos para que seja possível a absorção dos nutrientes, esses eventos são classificados como: moagem, acidificação, hidrólise e emulsificação (KLASING, 1999; BELL & WEAVER JR, 2002; WELKER *et al.*, 2008). Anexo ao intestino tem-se o pâncreas, o fígado e a vesícula biliar. Dentre os órgãos de frangos, o maior produtor e secretor de proteínas é o pâncreas. A concentração de enzimas no pâncreas é consideravelmente maior do que em outros órgãos que compõem o trato gastrointestinal de frangos. O pâncreas de frangos apresenta-se envolto pelo

duodeno e os ductos do pâncreas levam até o duodeno, amilases, lipases, tripsina, quimotripsina, carboxipeptidases A, B e C, desoxirribonucleases, ribonucleases e elastases. Além da produção de enzimas o pâncreas é responsável pela produção do bicarbonato que aumenta o pH do intestino delgado (BOSC-BIERNE *et al.*, 1984; PLIMMER; ROSEDALE, 1922; GO *et al.*, 1993; GUYTON; HALL, 2002).

Os frangos apresentam maior capacidade de digestão de alimentos ricos em amido no trato gastrointestinal, comparada com a digestão desses alimentos em suínos e humanos (SVIHUS *et al.*, 1997; STEIN; BOHLKE, 2007; WILLAMIL *et al.*, 2012; SVIHUS *et al.*, 2014). A atividade da enzima α -amilase no pâncreas de frangos é consideravelmente maior que os valores encontrados em pâncreas de bovinos, camelos e suínos (DAHLQVIST, 1961; SIDDONS, 1968; OSMAN; EL KHATIM, 1981; OSMAN, 1982).

O milho triturado é o principal ingrediente e fonte energética na ração para frangos. Por exemplo a ração inicial para frangos de 1 a 2 semanas pode ser preparada com 63 Kg de milho triturado, 33 kg de farelo de soja e 4 kg de núcleo (mistura de minerais, vitaminas e aminoácidos) (PRADO & MATOS, 2020). Os grânulos de amido variam no tamanho, forma e estrutura molecular. Zhang *et al.* (2006) relataram que a digestibilidade do amido está relacionada à organização da estrutura das camadas cristalina e amorfas nos grânulos de amido. Além disso, a barreira física da parede celular dos ingredientes da ração pode restringir o acesso das enzimas ao substrato e reduzir a digestibilidade do amido em animais (RAVINDRAN, 2013).

Aderibigbe *et al.* 2020 relataram que embora a digestibilidade de amido em frangos seja relativamente alta, certa proporção de amido não é digerida no intestino e desta forma a suplementação de α -amilase na ração melhora a performance de crescimento, digestibilidade aparente dos nutrientes e atividade das enzimas digestivas de frangos alimentados com dieta de milho e soja.

Liu *et al.* (2021) descreveram a otimização da suplementação de carboidratos exógenos em dieta a base de milho e soja para frangos de 1 a 3 semanas, para a máxima digestibilidade do amido, usando digestão gastrointestinal *in vitro* e método de superfície de resposta. Os autores verificaram que a combinação ótima das 6 carboidratos para a dieta a base de milho e soja para frangos de 1 a 3 semanas foi 297,39 U/g de glicoamilase, 549,72 U/g de pululanase, 3,01 U/g de maltase, 1.45,73 U/g de α -amilase termoestável, 278,64 U/g α -amilase com atividade em temperatura média e 1.985,97 U/g de α -amilase ativa a baixa temperatura, estimados pela liberação de açúcares redutores e digestibilidade da matéria seca.

3.2 Produção e consumo de carne de frango

A produção de frangos de corte apresenta destaque mundial decorrente do elevado consumo dessa matriz alimentícia, sendo que os valores de produção no ano de 2021 foram de aproximadamente 101 milhões de toneladas (USDA, 2022). O Brasil, atualmente, ocupa a terceira posição mundial de produção de frangos (14,34%) depois dos Estados Unidos da América (20,39%) e China (14,72%). Entretanto, a cadeia produtiva de frangos de corte destaca o Brasil como o maior exportador mundial de carne frango, alcançando aproximadamente 32% do volume total exportado dentre os países (EMBRAPA, 2022; USDA, 2022).

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estima-se que o Brasil apresente um crescimento de produção de frango de corte de 28,1%, passando de 14,18 milhões de toneladas no ano de 2020 para 18,17 milhões de toneladas no ano de 2030, com taxa média de crescimento anual de 2,5% durante cada ano.

3.3 Subprodutos do abate de frangos

De acordo com Toldrá *et al.* (2012), durante o abate de frangos apenas a carcaça é produto de comercialização e as demais partes do animal tornam-se subprodutos. Estas partes desprezadas podem representar cerca de 37% do peso total do animal vivo, as quais podem ser separadas como cabeça, pele, penas, crista, barbel, ossos, aparas de carne, sangue, tecidos adiposos, pé e órgãos internos. Os resíduos gerados do abate de frangos apresentam natureza orgânica e são altamente perecíveis, dessa forma demandam correto aproveitamento, pois quando descartados de forma inadequada podem gerar danos ao meio ambiente, proporcionar a presença de roedores, insetos e odores indesejados e acarretar na proliferação de micro-organismos (MORA; REIG; TOLDRÁ, 2014).

Segundo a Associação Brasileira de Reciclagem Animal, os principais resíduos gerados do abate de frango são as vísceras, as quais representam 16% do total de peso vivo, as penas representando 9% do peso vivo e o sangue que abrange 3% do peso vivo (ABRA, 2016). Nesse sentido, a partir do crescimento de produção em consumo, pode-se estimar que apenas no ano de 2020 foram gerados aproximadamente 28,3 milhões de toneladas de resíduos provenientes do abate de aves, sendo que deste montante 16,2 milhões de toneladas são representadas pelas vísceras de frangos.

3.4 Obtenção e purificação de proteases, lipases e α -amilases de vísceras de frangos

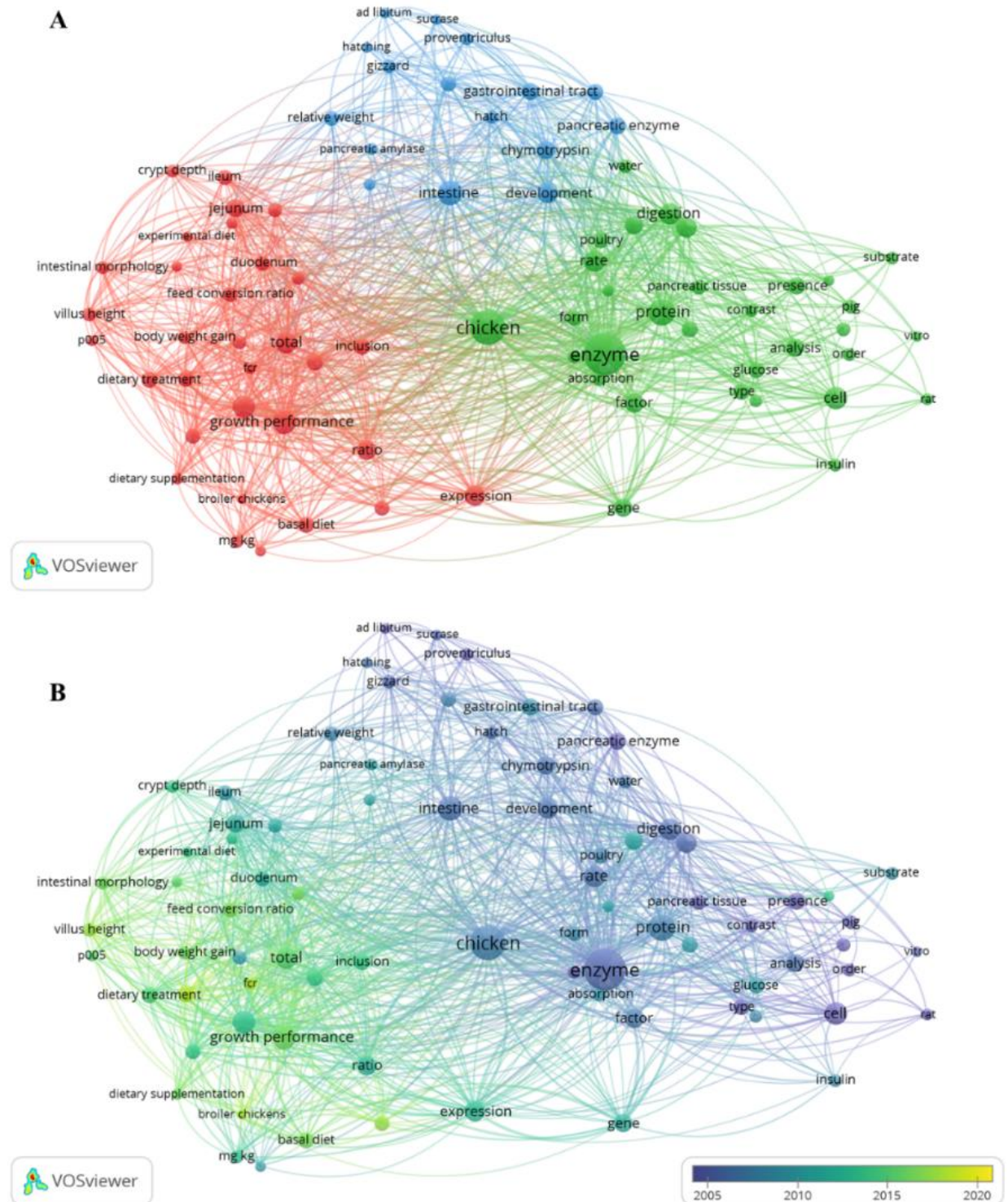
Afim de auxiliar a revisão bibliográfica foi utilizada a ferramenta bibliométrica para analisar os dados sobre estudos de enzimas obtidas de subprodutos de abate de frangos. Análises bibliométricas têm sido aplicadas para auxiliar diferentes áreas do conhecimento, estimar e

quantificar a produção científica de diferentes áreas ou assuntos para uma ou mais bases de dados, apresentando uma visão ampla dos estudos existentes por meio da interação de parcelas (ŞTIRBU *et al.*, 2015; MERIGÓ *et al.*, 2017; ROMANELLI *et al.*, 2018; BOUDRY *et al.*, 2018).

Para obter os resultados bibliométricos foram avaliados estudos disponibilizados pelas plataformas *Web of Science* e *Scopus*. Onde após exclusão de referências duplicadas obtiveram-se 520 artigos relacionados com subprodutos do abate de frangos e/ou enzimas. Essas referências foram avaliadas por meio das interações de parcela para a geração da nuvem de tendência para palavras chaves, facilitando uma melhor observação sobre o que foi publicado em relação ao assunto. Para a análise bibliométrica sobre obtenção, purificação e aplicação de enzimas obtidas de frangos, podemos observar por meio da Figura 2A que os resultados obtidos para a tendência das palavras-chave estão divididos em três *clusters*, apresentando maior concentração de itens no primeiro e segundo *cluster*, ambos com 32 itens cada.

As pesquisas envolvendo enzimas pancreáticas em frangos têm crescido ao longo dos anos, porém com foco principal na influência da alimentação, nutrição, suplementação e inclusão de diferentes compostos na ração de aves para estudar a modificação do conteúdo de enzimas do trato intestinal. Esses estudos são destacados no primeiro *cluster* onde são apresentadas as principais tendências relacionadas à dieta de frangos. Por meio da análise, pode-se observar uma alta associação para pesquisas envolvendo frangos, enzimas, proteínas, trato gastrointestinal, etc, no segundo (verde) e terceiro (azul) *cluster* (Figura 2A), nos quais são retratados dados relacionados aos principais estudos sobre a obtenção, purificação e aplicação das enzimas obtidas de frangos.

Figura 2: Análise de tendências de palavras-chave de publicações científicas sobre obtenção de enzimas pancreáticas de frangos nos bancos de dados Web of Science Core Collection e Scopus.



Por meio desta análise foi possível avaliar quais foram os anos de maior concentração de publicações sobre o assunto avaliado. Os estudos sobre obtenção de enzimas pancreáticas de frangos estão mais concentrados em anos anteriores a 2013 (FENDRI *et al.*, 2006; MANE *et al.*, 2010; RATHINA RAJ *et al.*, 2010a, b; MANE *et al.*, 2011; SARANGI *et al.*, 2011) onde estão incluídos para esse período os *clusters* 2 e 3 apresentados na Figura 2A, abordando as principais tendências relacionadas ao tema. Esses dados facilitaram a seleção dos artigos/estudos utilizados para a revisão bibliográfica e também para as discussões dos resultados apresentados no item 5.

As proteases constituem a classe de enzimas que estão presentes em maiores quantidades no trato gastrointestinal de aves, dessa forma são as enzimas mais estudadas quanto à extração e aplicação para os resíduos provenientes do abate de frangos (PUBOLS, 1991; GUYONNET *et al.*, 1999; DAMLE *et al.*, 2010a, b; RATHINA RAJ *et al.*, 2010a, b).

Guyonnet *et al.* (1999) descreveram a extração, purificação e caracterização parcial de tripsina, quimotripsina e elastase de pâncreas de frangos. Para a preparação do extrato bruto, uma amostra de 20 g de pâncreas de frangos em solução 0,5 Mol/L de CaCl_2 contendo 0,02% de azida de sódio foi ajustada para pH 7,5 com solução 1 Mol/L Tris e solução 1 Mol/L de ácido acético, incubada durante 9h a 25°C, e em seguida o pH foi ajustado para 8,0. Para a purificação de tripsina, quimotripsina e elastase foram utilizadas, na forma seqüencial, as colunas de cromatografia de afinidade Sepharose 4B-CMTI-I (inibidor de tripsina I de *Cucurbita maxima*), Sepharose 4B- BPTI (inibidor de tripsina de pâncreas bovino) e Sepharose 4B- STI (inibidor de tripsina de soja), respectivamente. Cada uma das proteases foram em seguida purificadas por cromatografia líquida FPLC em coluna de troca catiônica (Mono S HR 5/5). Para a purificação das enzimas, alíquotas do extrato bruto foram aplicadas na coluna de Sepharose 4B-CMTI-I (7 x 1,0 cm), de forma a não exceder 40% da capacidade de ligação. A coluna foi lavada com solução tampão 0,2Mol/L Tris-HCl pH 8,0 e as frações foram coletadas e reservadas para a próxima etapa de purificação. Em seguida a coluna foi lavada com o mesmo tampão contendo 1 Mol/L de NaCl até que a absorbância diminuísse abaixo de 0,01. A tripsina ligada foi eluída com 0,001Mol/L de HCl. As frações reservadas, com proteases não adsorvidas, obtidas da coluna de Sepharose 4B-CMTI-I foram aplicadas na coluna de Sepharose 4B- BPTI (10 x 1,5 cm). O mesmo procedimento descrito acima foi feito para eluição da quimotripsina. A amostra não adsorvida na coluna de Sepharose 4B- BPTI foi aplicada na coluna de Sepharose 4B- STI (7 x 1 cm), lavada com tampão 0,2Mol/L Tris-HCl pH 8,0 e eluída com 0,001 Mol/L de HCl. As frações contendo atividade de tripsina, quimotripsina e elastase foram liofilizadas e em seguida ressuspensas em tampão formato 50mMol/L pH 3,0, tampão acetato 50mMol/L pH

5,0 e tampão acetato 50mMol/L pH 4,7, respectivamente. Cada uma das proteases foram em seguida purificadas por cromatografia líquida (FPLC) usando a coluna catiônica Mono S HR 5/5. Após aplicação das amostras, as enzimas foram eluídas da coluna com as respectivas soluções tampão contendo gradiente de NaCl. A partir de 20 g de pâncreas de frango foram obtidos 0,015 U de tripsina, 3,41 U de quimotripsina e 0,027 U de elastase purificada. Após purificação por cromatografia de troca catiônica foram detectadas 3 formas de tripsina com pH de atividade acima de pH 5,0 e com atividade máxima na faixa de pH 8,0 – 8,2. A quimotripsina apresentou perfil similar com atividade máxima na faixa de pH 8,6 a 10. Foram observadas 2 formas de elastases com atividade em pH acima de 5,0 com atividade máxima em pH 8,6 e 8,2 para elastase 1 e elastase 2, respectivamente.

Mane *et al.* (2010) descreveram a extração e purificação de uma peptidase denominada aminopeptidase-N (APN) de intestino de frangos, com afinidade por leucina N-terminal comparável a aminopeptidases obtidas de *Bombyx mori* (bicho-da-seda) (HUA *et al.* 1998). Para a extração da enzima amostras de intestino limpo de frangos foram homogeneizadas com água destilada na proporção de 40% (m:v) em homogeneizador Polytron. Em seguida as amostras foram centrifugadas 37.000 x g por 40 minutos a 4 °C. O sobrenadante obtido foi saturado com 60 a 80% de (NH₄)₂SO₄, o precipitado resultante foi dissolvido em tampão de fosfato de sódio 10 mMol/L, pH 6,5 e dialisado contra o mesmo tampão. Posteriormente, foi aplicado em coluna de DEAE-Sepharose equilibrada com solução tampão fosfato de sódio 10 mMol/L, pH 6,5. As frações foram eluídas com a mesma solução tampão pH 6,5. As frações contendo atividade de aminopeptidase-N foram reunidas e concentradas por ultrafiltração em membrana YM-10 (Millipore, Co., EUA). A enzima foi em seguida purificada em coluna de Phenyl Sepharose equilibrada com solução tampão fosfato de sódio 10 mMol/L pH 6,5 contendo 10% de sulfato de amônio, e eluída com gradiente linear de 10–0% de sulfato de amônio em tampão fosfato de sódio 10 mMol/L, pH 6,5. A aminopeptidase de intestino de frangos foi purificada 123,7 vezes até a homogeneidade, com um rendimento de 3,43%. A enzima foi identificada como alanil-aminopeptidase ou aminopeptidase-N. A enzima apresentou massa molecular estimada em 180 kDa, possuindo atividade ótima a 60 °C e pH 6,0, sendo completamente inibida por 1-10 fenantrolina (1 mMol/L) e bestatina (1 mMol/L). A atividade específica da aminopeptidase-N do extrato bruto foi de 1 U/mg e foi constatado que essa enzima pode ser ativada por Ca²⁺ (0,5 mMol/L).

Posteriormente, Mane *et al.* (2011) descreveram a obtenção e purificação de uma aminopeptidase de intestinos de frangos, de massa molecular de 66 kDa, com elevada afinidade para resíduos de prolina N-terminal. Para a extração, as amostras de intestino limpo de frangos

foram homogeneizadas com uma solução tampão fosfato de sódio 10 mMol/L pH 8 (tampão A), na proporção de 40% (m:v) utilizando um homogeneizador Polytron. As amostras foram centrifugadas a 37.000 x g durante 40 minutos a 4 °C. O sobrenadante obtido foi saturado com 60 a 80% de (NH₄)₂SO₄, o precipitado resultante foi dissolvido em tampão de fosfato de sódio 10 mMol/L pH 8,0 e dialisado contra o mesmo tampão. O dialisado foi aplicado em coluna de DEAE-Sepharose equilibrada com tampão A. As proteínas adsorvidas foram eluídas com um gradiente linear de 0-0,5 Mol/L de NaCl em tampão A. As frações ativas foram reunidas e concentradas por ultrafiltração em membrana YM-10 (Millipore, Co, EUA). A enzima foi em seguida purificada em coluna de Phenyl Sepharose equilibrada com solução tampão de fosfato de sódio 10 mMol/L contendo 10% de sulfato de amônio, pH 8,0 e eluída com gradiente linear de 10–0% de sulfato de amônio em tampão fosfato de sódio 10 mMol/L, pH 8,0. As frações ativas foram reunidas e concentradas por ultrafiltração e submetidas a cromatografia de filtração em gel Superdex 200, equilibrado com tampão fosfato 10 mMol/L pH 7,0 contendo NaCl 150 mMol/L. A fração ativa foi concentrada usando Centricon (Millipore, Co, EUA). A pureza da enzima foi verificada por SDS-PAGE. A atividade específica da aminopeptidase purificada foi 1 U/mg de proteína. A enzima purificada apresentou atividade ótima em pH 7,5 e 55 °C. A atividade da enzima foi avaliada na presença de ânions (SCN⁻, Cl⁻, Br⁻ e I⁻) nas concentrações de 0,01 a 0,1 Mol/L, albumina (0,01-1,0 mg/mL) e desoxicolato (0,001-0,1%). A presença dos ânions aumentou a atividade da enzima para 158-187%, contudo, o aumento adicional na concentração dos ânions não promoveu aumento da atividade da enzima. A adição de albumina na concentração de 0,5 mg/mL resultou em aumento da atividade relativa da enzima para 159%, enquanto o desoxicolato na concentração de 0,01% mostrou aumento na atividade de até 184%. A atividade da aminopeptidase foi completamente inibida por 1-10 fenantrolina (1 mMol/L) e bestatina (100 µMol/L), e parcialmente inibida por EDTA (10 mMol/L) e Pefabloc (cloridrato de fluoreto de 4-2 aminoetil benzenosulfonil) (1 mMol/L).

Rathina Raj *et al.* (2010a) avaliaram alguns métodos para a extração de proteases do intestino de frangos. No teste de extração com água destilada, uma amostra de 25 g de intestino de frangos foi homogeneizada em 250 mL de água destilada gelada, utilizando homogeneizador Polytron a 2.000 rpm por 5 minutos. Posteriormente o material foi centrifugado a 5.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante obtido foi filtrado em papel de filtro Whatman n° 41, posteriormente diluído até um volume final de 250 mL e o material final obtido foi denominado extrato bruto. O extrato bruto apresentou 2,45 ± 0,08 mg/mL de proteína, estimada pelo método de Lowry. No estudo do pH ótimo de atividade de proteases do extrato bruto, a 37 °C por 30 minutos, utilizando caseína como substrato, foram observados picos de atividade de protease

nos valores de pH 2,4 a 2,8; 5,0; 7,0; 8,6 a 10,6. Os autores avaliaram também os efeitos do tratamento da massa visceral homogeneizada com os solventes como acetona e etanol, na obtenção de proteases. Nesse método amostras de massa visceral:solvente, nas proporções 1:1, 1:1,5 e 1:2 (m:v) foram homogeneizadas por 5 minutos a 2.000 rpm. As amostras foram filtradas em papel filtro Whatman nº 1, em seguida o precipitado foi tratado com solvente orgânico e o processo repetido. O precipitado obtido foi seco à vácuo a 40 °C e estocado a 5 °C. Para a determinação da atividade de protease 1 g da preparação enzimática em pó foi ressuspensa em 50 mL de água destilada. As preparações enzimáticas obtidas do tratamento de amostra de intestino de frangos com acetona na proporção 1:1,5 (m:v) apresentaram maior atividade específica de proteases ácidas, alcalinas e neutras (7; 29,7 e 31,58 U/mg de proteína/ minuto), respectivamente. A preparação de protease obtida do tratamento de intestino de frangos com acetona na proporção 1:1,5 (m:v) em pH neutro apresentou atividade específica de protease (31,58 U/mg de proteína/min) aproximadamente duas vezes maior do que a amostra de vísceras *in natura* (16,1 U/mg de proteína/min), no mesmo pH. As preparações obtidas do tratamento de amostra de intestino de frangos com etanol, apresentaram menor atividade específica de proteases ácidas, alcalinas e neutras comparadas com as vísceras *in natura*, e com as preparações enzimáticas obtidas do tratamento de intestino de frangos com acetona. Os autores testaram também a obtenção de proteases por acidificação da amostra de intestino de frangos com mistura de ácido fórmico e ácido propiônico até pH 4 e também incubação da mistura de amostra de intestino de frangos com 10% de glicose e 2% de NaCl por 5 dias a 27 ± 2 °C em condições micro-aerófilas, porém foram observados diminuição da atividade de protease.

No mesmo ano Rathina Raj *et al.* (2010b) descreveram a extração de proteases de amostras de 25 g de intestino de frangos, utilizando 250 mL de 4 soluções extratoras resfriadas diferentes: água destilada em pH 6,8; tampão fosfato 0,1 Mol/L em pH 7,0; solução de 1% de cloreto de potássio em pH 6,7 e solução 1% de cloreto de potássio contendo 0,1 Mol/L de Na₂EDTA. As amostras de vísceras foram homogeneizadas em Polytron PT3100 a 2.000 rpm durante 5 minutos e em seguida, centrifugadas a 5.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes obtidos foram filtrados em papel de filtro Whatman nº 41, até a obtenção de volume final de 250 mL e os filtrados foram denominados extratos enzimáticos brutos. A atividade específica dos extratos enzimáticos de protease não foi afetada com a utilização de diferentes soluções extratoras. O extrato bruto apresentou altos valores de atividade de protease em pH 10 ($23,05 \pm 3,09$ U/mg de proteína/min) porém não houve diferença estatística entre os valores de pH de 7 a 11. Os autores também avaliaram a obtenção de proteases utilizando tratamento das amostras de intestino de frangos com solventes orgânicos (acetona, álcool

isopropílico e etanol). As amostras de intestino de frangos foram homogeneizadas com solvente, na razão de 1:5 (m:v) por 5 minutos a 2.000 rpm durante 5 minutos e em seguida as amostras foram filtradas em papel de filtro Whatman n° 41. Os resíduos foram tratados duas vezes com solvente orgânico antes de serem secos a 40 °C, à vácuo. As amostras secas foram armazenadas em frascos a 5 °C pelo período de 3 meses, até o momento da determinação de atividade enzimática. As preparações obtidas do tratamento de intestino de frangos com acetona, etanol e álcool isopropílico apresentaram atividade de protease alcalina iguais a 24,93, 26,32 e 27,19 U/mg de proteína/min respectivamente. Esses valores foram maiores do que a atividade obtida para a protease alcalina nas vísceras *in natura* (20,49 U/mg de proteína/min). A preparação de enzima obtida do tratamento de intestino de frangos com álcool isopropílico apresentou maior atividade de proteases ácidas (9,69 U/mg de proteína/min), sendo que para a preparação obtida do tratamento de intestino de frangos com acetona não apresentou aumento significativo. A amostra obtida do tratamento de intestino de frangos com etanol apresentou aumento de 33% na atividade da protease ácida em relação a atividade encontrada para as vísceras *in natura*.

Sarangi *et al.* (2010) avaliaram um sistema aquoso de duas fases de polietilenoglicol e sais para a separação e purificação de proteases alcalinas do intestino de frangos. O extrato enzimático bruto foi obtido por meio de homogeneização de 50 g do intestino de frangos em 500 mL de água bidestilada isenta de íons resfriada, por cerca de 2-4 minutos a 3.000-4.000 rpm. A amostra homogeneizada foi centrifugada a 4 °C por 10-12 minutos a 5.000-6.000 rpm. E em seguida o sobrenadante foi filtrado em papel de filtro Whatman n° 41. O volume do filtrado foi completado até 500 mL e denominado extrato bruto. O teor de proteínas nos extratos foi determinado pelo método de Lowry *et al.* (1951) utilizando albumina de soro bovino como padrão. A atividade de protease do extrato enzimático bruto foi determinada em pH 8 usando solução 1% de caseína como substrato. Para a purificação das proteases o sistema aquoso de duas fases foi realizado em tubos de centrífuga de 15 mL, onde foi adicionado as quantidades apropriadas de solução estoque de polietilenoglicol e sal, sendo o volume completado para 10 mL com o extrato enzimático bruto e água destilada. Foram avaliados os sais sulfato de amônio, sulfato de magnésio, fosfato de potássio (1:1,5 de sal mono- e bibásico), fosfato de sódio (monobásico), citrato de sódio, sulfato de sódio e carbonato de sódio. Para avaliar os efeitos do polietilenoglicol e sais no sistema, a concentração de polietilenoglicol foi de 20% e a concentração de sal utilizado foi de 15, 20 e 25%. Os autores verificaram que o tipo de sal utilizado no sistema teve efeito significativo na partição da proteína e da protease alcalina. O teor de proteína no extrato bruto foi $4,8 \pm 0,58$ mg/mL. Foi observado em todos os testes que o conteúdo de proteína (mg/mL) foi maior na fase inferior (0,35-0,72 mg/mL) e também o

rendimento de proteína (13,5-33,5%). O rendimento de proteína na fase superior foi na faixa de 8,6 a 21,6%, sendo obtido maior rendimento de proteína no sistema com polietilenoglicol e sulfato de sódio. O coeficiente de partição da proteína variou de 0,29 a 0,89 indicando que a partição da proteína do intestino de frangos no sistema foi afetada pelo sal utilizado. Foram obtidos 22,0% e 50,9% de rendimento total de proteína (total das fases superior e inferior) utilizando respectivamente os sistemas contendo os sais MgSO_4 e NaSO_4 , indicando perda de proteína. A atividade específica da protease do extrato enzimático bruto foi $11,4 \pm 1,28$ unidades/mg de proteína. A atividade de protease foi maior na fase superior para todos os sais (9,9-84,2 unidades/mg de proteína.). A atividade de protease mais alta (84,2 unidades/mg de proteína.) foi encontrada na fase superior do sistema de polietilenoglicol e citrato de sódio, seguido pelo sistema de polietilenoglicol e sulfato de magnésio (69,1 unidades/mg de proteína.) e fosfato de potássio (60,7 unidades/mg de proteína.).

Srisantisaeng *et al.* (2013) estudaram a extração e caracterização de proteases presentes no intestino e pâncreas de galos e aplicaram o extrato de protease na obtenção de ácido hialurônico. A obtenção do extrato enzimático de protease foi realizada conforme o método descrito por Rathina Raj *et al.* (2010b). Uma amostra de 1 kg de intestino e pâncreas de aves foram cortados em pedaços, triturados em misturador manual por 3 min e misturadas com água destilada fria na proporção de 1:1 (m/m) por 5 min. A suspensão foi centrifugada a $10.000 \times g$ por 10 min a 4 °C para a remoção dos sólidos insolúveis. O sobrenadante foi filtrado em papel de filtro (n° 4) e liofilizado para a obtenção do pó bruto da enzima. A atividade de protease foi determinada pelo método de Cupp-Enyard (2008) com modificações, utilizando caseína como substrato. Foi obtido 27,20 g de extrato enzimático liofilizado com $0,70 \pm 0,01$ mg de proteína/mg e o maior valor de atividade de protease (0,35 U/mg) foi obtido em pH 7,5 a 60 °C.

Gené (2019) determinou a atividade de protease, α -amilase e lipase em extratos brutos de pâncreas + intestino delgado e pâncreas + duodeno *in natura*, obtidas de frangos homogeneizadas em Blixer 3[®] RobotCoupe de 3,7 L, sendo verificado que não houve diferença na extração das enzimas após 1 e 3 minutos de homogeneização. Os extratos brutos de pâncreas + intestino delgado e pâncreas + duodeno *in natura* apresentaram 740 ± 58 U/g e 1.797 ± 167 U/g de protease, 364 ± 27 U/g e 547 ± 72 U/g de α -amilase e 92 ± 8 U/g e 214 ± 24 U/g de lipase, respectivamente. As amostras de pâncreas + duodeno de frangos *in natura* apresentaram atividade de protease, α -amilase e lipase cerca de 1,65 a 2,85 vezes maior do que as amostras de pâncreas + intestino delgado. Entre os métodos avaliados para obtenção das preparações enzimáticas, a homogeneização em água (4 °C) e posterior precipitação com acetona na proporção 1:5 (m:v) foi mais eficaz para obtenção de proteases e α -amilases, sendo obtido

valores de atividade de 10.704 e 7.264 U/g de proteína, respectivamente. O método mais eficaz para obtenção de preparações enzimáticas de lipase foi a homogeneização manual de pâncreas + intestino delgado com água (4 °C) por 30 segundos, sendo obtido atividade específica de lipase igual a 608 U/g de proteína. A liofilização das preparações pancreáticas e intestinais de frangos resultou em inativação das enzimas, reduzindo a atividade enzimática específica para 62 a 65% de protease, 12 a 17% de α -amilase e 12 a 13% de lipase. As proteases das preparações enzimáticas de pâncreas + intestino delgado de frangos apresentaram atividade ótima em pH 7,8 e 55,2 °C e estabilidade na faixa de pH 6 a 9 em temperaturas abaixo de 35 °C durante 1 hora, por DCCR. As lipases apresentaram, por DCCR, atividade ótima em pH 7,9 e 56,7 °C e estabilidade na faixa de pH 5,0 a 10,0 e em temperaturas abaixo de 45 °C. As α -amilases de pâncreas + intestino delgado de frangos apresentaram atividade ótima em pH 7 e 35-50 °C.

As amilases representam o segundo grupo de enzimas presente em maior concentração no pâncreas dos frangos (PUBOLS, 1991). Existem duas principais amilases presentes no pâncreas de frangos: glucoamilase e α -amilases (OSMAN, 1982). De acordo com Sundarram & Murthy (2014) a α -amilase apresenta grande potencial de aplicação industrial. Contudo, existem poucos trabalhos de recuperação e caracterização das amilases de frangos.

Buonocore *et al.* (1977) estudaram a purificação e caracterização de α -amilases provenientes de pâncreas de frangos. Para a purificação, amostras de pâncreas de frangos foram homogeneizadas em solução tampão cacodilato de sódio 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,01 Mol/L de NaCl e 0,01 Mol/L de CaCl₂ na proporção de 1:5 (m:v) a 0 °C. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 20.000 x g por 2 horas a 4 °C. O sobrenadante denominado extrato bruto apresentou 2.000 U/mL de α -amilase. A α -amilase do extrato bruto foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose 2B ligada a inibidores de amilase de albumina de grãos de trigo conforme descrito por Buonocore *et al.* (1975), equilibrada com tampão cacodilato de sódio 0,05 Mol/L H 7,0, concentradas por ultrafiltração em membrana PM-10 Diaflo (Amicon Corp., Lexington, MASS., EUA) e aplicado novamente em coluna de Sephadex G-25 equilibrada com tampão de cacodilato de sódio 0,05 Mol/L pH 7,0. A α -amilase foi purificada 6,1 vezes, sendo obtido recuperação de 16% da atividade inicial. A α -amilase purificada apresentou atividade ótima em pH 7,5 e 37 °C e mostrou-se estável a 4 °C após 24 horas na faixa de pH alcalino, porém apresentou rápida redução de atividade (30 minutos) em valores de pH abaixo de 7. A α -amilase purificada foi ativada por Cl⁻ na concentração 0,01 Mol/L e inativada irreversivelmente pela diálise a 4 °C em água ou solução 0,1 mMol/L de sulfato de sódio.

Osman (1982) avaliou as amilases presentes no pâncreas e nas diferentes partes anatômicas do intestino de frangos. Foram coletados o pâncreas, duodeno, jejuno, íleo, ceco e cólon de frangos para a realização desse estudo. O extrato enzimático foi obtido da homogeneização de cada um dos tecidos em água destilada, na proporção de 1:10 (m:v), por 3 minutos em alta velocidade. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 3.000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente. A atividade da α -amilase do sobrenadante obtido foi determinada de acordo com o método descrito por Dahlqvist (1961), com modificações. O extrato enzimático obtido de pâncreas de frangos apresentou maior atividade de α -amilase (22.000 U/g de tecido/minuto) e o extrato enzimático proveniente do jejuno apresentou 80% da atividade α -amilase encontrada no intestino de frangos (3.315 a 4.550 U/g de tecido/minuto).

As lipases hidrolisam triglicerídeos liberando ácidos graxos livres, monoglicerídeos ou diglicerídeos. As lipases podem ser obtidas de fontes animais, vegetais ou de micro-organismos e são industrialmente utilizadas para hidrólise de triglicerídeos, catálise de reações de interesterificação ou transesterificação de óleos e gorduras (HOUDE *et al.*, 2004).

Madhusudhan *et al.* (1988), estudaram a obtenção de lipase a partir do pâncreas de frangos como fonte de pancreatina para o tratamento de insuficiência de enzimas pancreáticas em humanos. As amostras de pâncreas de frangos foram homogeneizadas em tampão fosfato 0,02 Mol/L pH 8 contendo 0,9% NaCl (1:5, m:v) por 5 minutos e centrifugadas a 10.000 x g por 20 min. O sobrenadante foi filtrado em lã de vidro para remoção da gordura. Amostras do filtrado foram misturadas com acetona, álcool isopropílico ou etanol a -20 °C, na proporção 1:10 (v:v) e centrifugadas novamente a 20.000 x g por 20 min. Os precipitados foram desidratados por secagem a vácuo. Os autores observaram que a lipase pode apresentar aumento de atividade em até 3 vezes conforme o vigor da homogeneização dos tecidos pancreáticos e que para a extração da lipase é necessário romper o maior número possível de células, ao contrário da extração de algumas proteases. Dentre os solventes testados, apenas a preparação obtida com álcool isopropílico apresentou atividade de lipase (24 U/mg de pancreatina) superior à das pancreatinas comerciais com rendimento de 15% de lipase, entretanto, a atividade de tripsina e quimotripsina foram menores do que as de pancreatinas comerciais em função da não ativação do zimogênio.

Fendri *et al.* (2006) estudaram a purificação e caracterização de lipase pancreática de frangos. A preparação bruta de lipase foi obtida utilizando amostras de pâncreas de frangos previamente delipidificadas conforme o método descrito por Verger *et al.* (1969). Pedacos de pâncreas congelados foram homogeneizados utilizando clorofórmio e n-butanol (4:1, v:v). Os precipitados foram separados por decantação, em seguida tratados com acetona e éter e

submetidos a secagem a vácuo, para a obtenção do pó delipidificado. Posteriormente, 3 g do pó de amostra do pâncreas de frangos previamente delipidificado foi homogeneizado em 30 mL de solução tampão Tris-HCl 25 mMol/L pH 8,2 contendo 25 mMol/L de NaCl e 2 mM de benzamidina (inibidor competitivo da tripsina e serina proteases). O sobrenadante (25 mL) foi saturado 60% com sulfato de amônio sob agitação e mantido a 4 °C por 30 minutos. Após centrifugação a 10.000 rpm durante 20 min, o precipitado foi ressuspense em 10 mL do tampão. O material insolúvel foi removido por centrifugação a 10.000 rpm durante 10 min. A lipase foi purificada por cromatografia em coluna de DEAE-celulose equilibrada com tampão Tris-HCl 25 mMol/L pH 8,2 contendo 25 mMol/L de NaCl e 2 mMol/L de benzamidina (tampão A), coluna de filtração em gel Sephacryl S-200 equilibrada com tampão A e coluna de troca aniônica Mono-Q (trimetilamônio) equilibrada com tampão A. A atividade de lipase do extrato bruto, utilizando o substrato tributirina e 0,004 Mol/L de NaTDC (taurodeoxicolato de sódio) foi $95,3 \pm 7,02$ U/mg. A precipitação de proteínas com sulfato de amônio 60% de saturação aumentou a atividade específica da lipase para $508,63 \pm 11,3$ U/mg (fator de purificação de $5,34 \pm 0,28$) e após todos os processos de purificação foi obtido 9.000 U/mg (fator de purificação de $94,72 \pm 6,47$). A lipase purificada foi ativada por tripropionina e éster vinílico e inibida na presença de detergentes sintéticos (TX-100) e proteínas anfipáticas (BSA).

3.5 Aplicação potencial de proteases, lipases e α -amilases de origem animal

Damle *et al.* (2010a) sugeriram que proteases obtidas a partir do abate de frangos podem ser aplicadas em alimentos para tenderização de carne, realçador de sabor ou para a remoção de gosto amargo de hidrolisados proteicos. O extrato enzimático contendo proteases obtido a partir do trato gastrointestinal de frangos pode ser utilizado para aumentar o valor biológico de proteínas, por meio da hidrólise e obtenção de peptídeos solúveis e aminoácidos mais disponíveis ao metabolismo animal.

As proteases podem ser utilizadas para obtenção de hidrolisados proteicos e peptídeos bioativos. Peptídeos bioativos são definidos como fragmentos específicos de proteínas que apresentam impacto positivo sobre as funções ou condições corporais e podem influenciar a saúde humana (KITTS & WEILLER, 2003). Estudos utilizando métodos *in vitro* e *in vivo* apresentam uma ampla variedade de ações biológicas atribuídas aos peptídeos bioativos, sendo elas, atividade antioxidante, antimicrobiana, antitrombótica, imunomoduladora, hipocolesterolêmica, anti-hipertensiva, dentre outras (KORHONEN & PHILANTO, 2006; RIZZELLO *et al.*, 2016).

Srisantisaeng *et al.* (2013) estudaram a aplicação do extrato enzimático de proteases obtidas a partir de pâncreas e intestino de galos na obtenção de ácido hialurônico de cristas de frangos. O ácido hialurônico é utilizado principalmente em colírios e produtos cosméticos. Bebidas para hidratação e preparações em pó contendo hidrolisados de colágeno, ácido hialurônico e extratos de frutos como melão e pêssago também são encontradas no mercado internacional.

Lasekan *et al.* (2013) sugeriram a obtenção de proteases e ácidos graxos poli-insaturados a partir de resíduos do abate de frangos, que poderiam ser utilizados nas indústrias de produtos para nutrição humana e cosméticos.

As preparações de protease, α -amilase e lipases obtidas de resíduos de frangos poderiam ser utilizadas para melhorar a digestibilidade de rações para aves e animais domésticos (GENÉ, 2019).

3.5.1 Obtenção de hidrolisados proteicos com atividade antioxidante

Hidrolisados proteicos podem ser definidos como produtos compostos por aminoácidos livres e peptídeos obtidos da hidrólise de frações específicas das proteínas, que apresentam variação de massa molecular de acordo com o grau de hidrólise. Em geral, os peptídeos são compostos por menos de vinte resíduos de aminoácidos e apresentam massa molecular menor do que 6 kDa. Os hidrolisados podem apresentar funções biológicas como: atividade antioxidante; antibacteriana; anti-inflamatória; anti-hipertensiva e estimulante do sistema imunológico e devido a esse fato permitem a sua utilização como ingrediente funcional e/ou nutracêutico, tornando-os potenciais substitutos de substâncias sintéticas e aumentando o seu interesse para a indústria (DONG *et al.*, 2008; THEODORE, 2008; DONG *et al.*, 2010; CASTRO & SATO, 2015).

As espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio são naturalmente produzidas no metabolismo celular. Esses radicais livres são considerados essenciais para a manutenção da homeostase e estão envolvidos nos processos fisiológicos e patológicos, dentre estes a transdução de sinal, diferenciação celular e defesa de patógenos. Entretanto, os radicais livres são moléculas consideradas altamente reativas que, quando produzidas em excesso pelo organismo podem acarretar problemas à saúde, devido às oxidações causadas nas células favorecendo o desenvolvimento de diversas patologias. Esses radicais são também moléculas instáveis que sequestram elétrons de outras moléculas para que possam se estabilizar, levando a danos potenciais por reagirem com as moléculas de DNA, outros componentes da membrana celular e proteínas (ALUKO, 2012; EBRAHIMI *et al.*, 2019; HUANG *et al.*, 2019).

De acordo com a Grand View Research (2020), o mercado mundial de hidrolisados proteicos é segmentado com base no produto em hidrolisados de soro de leite, hidrolisados de proteínas de origem animal e vegetal. Sendo que os hidrolisados de soro de leite correspondem a maior participação do mercado, US\$ 8,7 bilhões em 2019. Contudo, os hidrolisados obtidos de proteínas de origem vegetal tem ganhado destaque com o passar dos anos e as mudanças no mercado consumidor. Dentre os produtos de destaque no mercado mundial de proteínas de origem vegetal, a proteína de ervilha tem se destacado em relação as demais, isso se deve ao fato de sua ampla possibilidade de aplicações e benefícios nutricionais proporcionados pelo consumo de proteína de ervilha. O mercado global da proteína de ervilha no ano de 2020 foi estimado em aproximadamente US\$ 745 milhões, registrando uma taxa composta de crescimento anual de 13,5% e pode chegar a US\$ 1.4 bilhões até o ano de 2025 (Markets & Markets, 2020).

Santos (2017) estudou a produção, purificação, caracterização e aplicação de protease de *Bacillus licheniformis* na hidrólise das proteínas de arroz e ervilha. A protease parcialmente purificada de *Bacillus licheniformis* LBA 46 e a protease comercial Alcalase® 2,4L foram utilizadas para produzir hidrolisados de proteínas de arroz e ervilha utilizando pH 6-10 e concentração de protease entre 50-150 U/mL, como variáveis independentes. O comportamento das enzimas em relação às variáveis independentes foi semelhante, tendo a mesma faixa de otimização de pH 9-10 e concentração de protease variando entre 50-150 U/mL. As condições de hidrólise, valor de pH 10 e concentração de enzima de 100 U/mL foram selecionadas como as principais condições de processamento para a hidrólise das proteínas de arroz e ervilha. Para a proteínas de ervilha os valores experimentais para o DPPH, ORAC e FRAP nas condições escolhidas foram 3,64, 568,7 e 9,18 $\mu\text{Mol TE g}^{-1}$ para hidrolisados com a protease de *Bacillus licheniformis* LBA 46, e 3,77, 719,67 e 9,17 $\mu\text{Mol TE g}^{-1}$ para hidrolisados com Alcalase® 2,4L, respectivamente. Em comparação com as proteínas de ervilha não hidrolisada, a atividade antioxidante estimada pelo método de DPPH (8,04 $\mu\text{Mol TE g}^{-1}$) e FRAP (25,07 $\mu\text{Mol TE g}^{-1}$) foi reduzida. Mas, a atividade antioxidante medida pelo ensaio ORAC, após otimização, foi maior que a atividade para a proteína intacta (77,61 $\mu\text{Mol TE g}^{-1}$), aumentando 7,33 e 9,27 vezes para a protease de *Bacillus licheniformis* LBA 46 e a protease comercial Alcalase® 2,4L, respectivamente. Já para o hidrolisado de proteína de arroz os valores experimentais para ORAC e FRAP as condições selecionadas foram 940 e 18,78 $\mu\text{Mol TE g}^{-1}$, respectivamente, para os hidrolisados de proteína de arroz preparados com a protease de *Bacillus licheniformis* LBA 46, e 1.001,94 e 19,31 $\mu\text{Mol TE g}^{-1}$, respectivamente, para os hidrolisados de proteína de arroz preparados com Alcalase® 2,4L. Após a otimização das condições de hidrólise enzimática, os

valores de atividade antioxidante aumentaram quando comparados à proteína de arroz não hidrolisada: 324,97 $\mu\text{Mol TE g}^{-1}$ (ORAC) e 6,14 $\mu\text{Mol TE g}^{-1}$ (FRAP). Para a hidrólise realizada com a protease de *Bacillus licheniformis* LBA 46, houve um aumento de 2,9 vezes para ORAC e 3,05 vezes para o ensaio FRAP. Para a hidrólise realizada com Alcalase® 2,4L, houve um aumento de 3,08 vezes para ORAC e 3,14 vezes para o ensaio FRAP.

Cavallaro (2019) avaliou a obtenção de peptídeos com atividade biológica, incluindo funções antioxidantes por meio da hidrólise enzimática de proteínas concentradas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) variedade carioca e vermelho, utilizando proteases. A hidrólise foi realizada por planejamento de mistura de enzimas (Flavourzyme® 500 L; Alcalase® 2,4 L; e Neutrase® 0,8 L). No estudo a atividade antioxidante foi avaliada utilizando os métodos de ABTS; FRAP e ORAC, sendo que os melhores resultados foram obtidos para hidrolisados obtidos do feijão carioca com $\frac{1}{3}$ de Flavourzyme® ; $\frac{1}{3}$ Alcalase® ; e $\frac{1}{3}$ Neutrase®, sendo obtidos 113,91 $\mu\text{Mol TE g}^{-1}$ para o método ABTS, 27,90 $\mu\text{Mol TE g}^{-1}$ para o método FRAP e 825,2 $\mu\text{Mol TE g}^{-1}$ para o método ORAC.

Felix *et al.* (2021) avaliaram a atividade antioxidante em emulsões obtidas com hidrolisados concentrados de feijão fava em pH 3,0, 5,0 e 8,0. Foram estudados dois tipos de hidrolisados para a preparação das emulsões, sendo com baixo e alto teor de hidrólise da proteína de feijão fava. As avaliações para atividade antioxidantes foram realizadas pelos métodos de FRAP e ORAC e ocorreram em três momentos, no primeiro dia de preparo da emulsão, após 15 dias do preparo e após simulação *in vitro* de digestão gastrointestinal. Foram relatados melhores resultados de atividade antioxidante para a emulsão preparada com hidrolisado de proteína de feijão com menor grau de hidrólise, sendo que para os métodos de FRAP e ORAC foram obtidas atividades de $1.108,6 \pm 3,8$ e $1.159,9 \pm 20,5$ $\mu\text{Mol TE g}^{-1}$, respectivamente.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta das vísceras de frangos

Amostras de vísceras de aves da espécie *Gallus gallus*, da linhagem Cobb, de 30 a 33 dias de idade com peso médio entre 1,4 a 1,6 kg, foram coletadas imediatamente após o abate das aves no frigorífico da BRF S.A, localizado em Carambeí – Paraná. As amostras de pâncreas e duodeno foram separadas manualmente e armazenadas congeladas a -12 °C.

4.2 Obtenção da preparação bruta de pâncreas e duodeno de frangos

As amostras de pâncreas e duodeno armazenadas a -12 °C foram cortadas em pedaços com o auxílio de faca. Posteriormente 500 g de amostras foram homogeneizadas por 1 minuto em Blixer 3[®] da marca RobotCoupe de 3,7 L. A amostra homogeneizada denominada preparação bruta de pâncreas e duodeno foi dividida em alíquotas de 50 g e congeladas separadamente em tubos plásticos e armazenadas a -12 °C. A preparação bruta de pâncreas e duodeno foi utilizada para o estudo de obtenção de proteases, lipase e α -amilase.

A Figura 3 ilustra o fluxograma das análises realizadas no estudo.

4.3 Obtenção das preparações enzimáticas de protease, α -amilase e lipase da preparação bruta de pâncreas e duodeno de frangos

4.3.1 Obtenção de preparações enzimáticas por homogeneização da preparação bruta de pâncreas e duodeno em água destilada ou solução tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5mM de CaCl₂

Amostras de 10 g da preparação bruta de pâncreas e duodeno de frangos obtida de acordo com o item 4.2 foram misturadas com 10 mL de água destilada gelada (4 °C) ou 10 mL de solução tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5mM de CaCl₂ (4 °C) na razão 1:1 (m:v), com agitação manual com bastão por 5 minutos ou com auxílio de agitador de hélice por 1 minuto, em banho de gelo. Os tubos de centrífuga de 50 mL contendo as amostras homogeneizadas foram centrifugados a 11.000 x g por 45 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi filtrado com gaze para remoção de gordura e outras partículas sólidas, posteriormente foi congelado a -12 °C. As atividades enzimáticas de protease, α -amilase e lipase foram determinadas conforme descrito nos itens 4.4.1, 4.4.2 e 4.4.3, respectivamente. A concentração de proteína foi estimada pelo método de Lowry modificado por Hartree (1972).

4.3.2 Obtenção de preparações enzimáticas por homogeneização da preparação bruta de pâncreas e duodeno em solução 0,9% de NaCl e Tampão Tris-HCl 0,05 Mol/L pH 8,0 contendo 50 mMol/L de CaCl₂

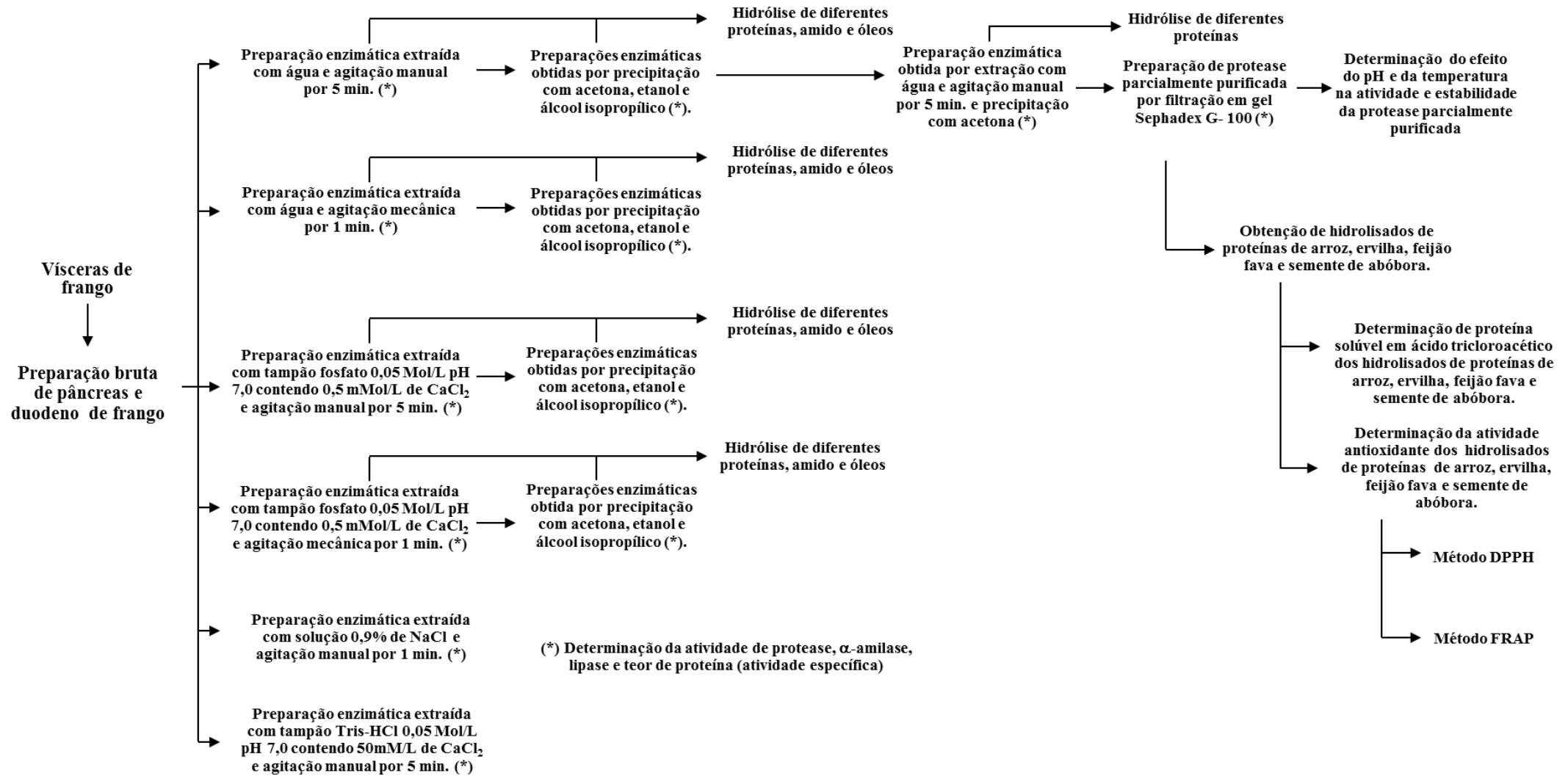
Amostras de 2 g de preparação bruta de pâncreas e duodeno de frangos obtida de acordo com o item 4.2 foram misturadas com 18 mL de solução 0,9% de NaCl, a 4 °C na razão 1:9 (m:v) e 2 g de preparação bruta com 18 mL de Tampão Tris-HCl 0,05 mMol/L pH 8,0 contendo 50 mM de CaCl₂ a 4 °C na razão 1:9 (m:v), com auxílio de bastão, por 5 minutos em banho de gelo. Os tubos de centrífuga de 50 mL contendo as amostras homogeneizadas foram centrifugados a 11.000 x g por 45 minutos a 4 °C e o sobrenadante filtrado com gaze para remoção de gordura e outras partículas sólidas. As atividades enzimáticas de protease, α -amilase e lipase foram determinadas conforme descrito nos itens 4.4.1, 4.4.2 e 4.4.3., respectivamente. A concentração de proteína foi estimada pelo método de Lowry modificado por Hartree (1972).

4.3.3 Obtenção de preparações enzimáticas da preparação bruta de pâncreas e duodeno por extração em água destilada ou solução tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L de CaCl₂, seguido de precipitação com solventes orgânicos: acetona, etanol ou álcool isopropílico

Amostras de 10 g da preparação bruta de pâncreas e duodeno foram misturadas em 10 mL de água destilada resfriada a 4°C ou 10 mL de solução tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L de CaCl₂ (4 °C) (1:1, m:v), com auxílio de bastão, por 5 minutos, em banho de gelo. Os tubos de centrífuga de 50mL contendo as amostras foram centrifugados a 11.000 x g por 45 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi filtrado com gaze para remoção de gordura e outras partículas sólidas. Amostras do filtrado foram submetidas a precipitação utilizando três diferentes solventes: acetona, álcool isopropílico e etanol. Para o processo de precipitação, 50 mL de amostras do filtrado e 100 mL (1:2, v:v) de acetona, álcool isopropílico ou etanol a -16 °C foram homogeneizadas manualmente com bastão por 2 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 11.000 x g por 45 minutos a 4 °C. O precipitado foi armazenado em geladeira a 4 °C durante 48 horas para evaporação dos solventes. O precipitado foi congelado a -12 °C e armazenado até o momento das determinações enzimáticas e aplicação das enzimas.

Para comparação estatística das médias entre os diferentes métodos de extração foi utilizado o teste de Tukey (Minitab® 19).

Figura 3: Fluxograma de análises



4.4 Determinação da atividade enzimática de protease, α -amilase e lipase

4.4.1 Determinação da atividade enzimática de protease

A atividade proteolítica foi avaliada utilizando azocaseína como substrato e determinada segundo a metodologia de Charney & Tomarelli (1947), modificada por Castro & Sato (2013). As misturas de reação contendo 0,5 mL de azocaseína (0,5% m:v) em tampão fosfato 0,1 Mol/L pH 8,0 e 0,5 mL de solução enzimática foram incubadas por 40 min a 37 °C e a reação paralisada pela adição de 1,0 mL de solução 10% de ácido tricloroacético (TCA). A mistura reacional foi submetida a centrifugação a 11.000 x g por 15 minutos a 25 °C e o sobrenadante coletado e misturado a 1 mL de solução 5 M de hidróxido de potássio para formação do composto cromóforo e a leitura de absorbância realizada a 428 nm. Uma unidade de atividade de protease foi definida como a quantidade de enzima capaz aumentar 0,01 na absorbância a 428 nm por minuto de reação entre o branco reacional e a amostra nas condições do ensaio.

4.4.2 Determinação da atividade enzimática de α -amilase

A atividade de α -amilase foi avaliada pelo método de Osman (1982) com modificações, por meio da determinação de açúcares redutores formados a partir de substrato amido solúvel. Para a preparação do substrato, uma suspensão de 2 g de amido solúvel em 50 mL de água destilada foi aquecida por 10 minutos em ebulição. Após atingir a temperatura ambiente, foi adicionado 50 mL de tampão fosfato 0,04 Mol/L pH 6,9, contendo 0,0134 Mol/L de NaCl e em seguida o volume foi completado para 100 mL com água destilada. A mistura de 0,5 mL de solução 2% de amido solúvel em tampão fosfato 0,004 Mol/L pH 6,9; contendo 0,0134 Mol/L de NaCl e 0,5 mL de solução enzimática foi incubada a 37 °C durante 10 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 1mL de reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e em seguida os tubos foram aquecidos em banho-maria em ebulição por 5 minutos. Em seguida, foi realizado o resfriamento em banho de gelo e adicionado 8 mL de água destilada. A absorbância das soluções foi medida a 540 nm. Uma unidade de atividade de α -amilase foi definida como 1 mg de açúcares redutores expressos como glicose liberados a partir de amido durante 1 minuto a 37 °C, entre o branco reacional e a amostra nas condições do ensaio.

4.4.3 Determinação da atividade enzimática de lipase

A atividade de lipase foi determinada pelo método de Rathelot *et al.* (1976) modificado. Frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 5 mL de emulsão de óleo de oliva (25% de óleo de oliva + 75% de solução 7% de goma arábica), 2 mL de tampão fosfato 0,1 Mol/L pH 7,0 e 1 mL de solução enzimática foram incubados em banho-maria Dubnoff com agitação linear (45

oscilações/min) a 40 °C por 30 min. Após a incubação, a reação foi interrompida pela adição de 5 mL de acetona-etanol (1:1, v:v). Os ácidos graxos liberados foram titulados com NaOH 0,05 Mol/L, na presença de 3 gotas de fenolftaleína 1% em etanol, como indicador. Uma unidade de atividade de lipase foi definida como a quantidade de enzima que libera um μmol de ácido graxo por minuto de reação entre o branco reacional e a amostra nas condições do ensaio.

4.5 Determinação da concentração de proteína

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry modificado por Hartree (1972) utilizando-se albumina de ovo como padrão.

4.6 Hidrólise de proteínas, amido e óleos vegetais com preparações enzimáticas de pâncreas e duodeno de frangos

4.6.1 Hidrólise de proteínas com preparações enzimáticas de pâncreas e duodeno de frangos

Tubos de ensaio contendo 2 mL de solução 1% de albumina de ovo, caseína ou farinha de vísceras de frangos e 1 mL de solução enzimática foram incubados a 50 °C por 30 minutos. O grau de hidrólise foi estimado conforme método descrito no item 4.6.1.1. Foram testadas as preparações enzimáticas de pâncreas e duodeno de frangos extraídas com água e agitação manual por 5 minutos; água e agitação mecânica com hélice por 1 minuto; tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L de CaCl_2 e agitação manual por 5 minutos; tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 e agitação mecânica com hélice por 1 minuto; extração com água seguida de precipitação com acetona; extração com água seguida de precipitação com etanol; extração com água seguida de precipitação com álcool isopropílico; extração com tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L de CaCl_2 seguida de precipitação com acetona; extração com tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L de CaCl_2 seguida de precipitação com etanol e extração com tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L de CaCl_2 seguida de precipitação com álcool isopropílico.

4.6.1.1 Determinação do teor de proteína solúvel em ácido tricloroacético, nos hidrolisados proteicos

O teor de proteína solúvel em ácido tricloroacético (TCA) dos hidrolisados, forma indireta de avaliar o grau de hidrólise, foi avaliado conforme método descrito por Peričin *et al.*

(2009) e Matos (2020). Uma alíquota de 0,5 mL de solução 0,44 Mol/L de ácido tricloroacético foi adicionada em microtubos contendo 0,5 mL de hidrolisado (0,8 mg/mL). A mistura foi incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente e posteriormente centrifugada a 17.000 x g durante 15 min. O sobrenadante foi utilizado para medir o conteúdo de proteína pelo método de Lowry modificado por Hartree (1972) usando albumina de soro bovino como padrão. Os resultados foram expressos como porcentagem da razão entre o teor de proteína solúvel em ácido tricloroacético e o teor de proteína total no hidrolisado.

4.6.2 Hidrólise de amido com preparações enzimáticas de pâncreas e duodeno de frangos

Tubos de ensaio contendo misturas de 2 mL de suspensão 1% de amido de milho, mandioca, batata, amido de milho com alto teor de amilose, amido de milho ceroso ou amido de arroz ceroso (previamente gelatinizados em água, e diluídos em tampão Tris-HCl 0,02 Mol/L pH 7,5 contendo concentração final de 0,01 Mol/L de NaCl e 0,1 Mol/L de CaCl₂) e 1 mL de solução enzimática foram incubados a 37 °C e 50 °C por 30 minutos (BUONOCORE, 1977). O teor de açúcares redutores foi estimado pelo método de Somogyi-Nelson (1945). Foram testadas as preparações enzimáticas de pâncreas e duodeno de frangos extraídas com água e agitação manual por 5 minutos; água e agitação mecânica com hélice por 1 minuto; tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L de CaCl₂ e agitação manual por 5 minutos; e tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 e agitação mecânica com hélice por 1 minuto.

4.6.3. Hidrólise de óleos com preparações enzimáticas de pâncreas e duodeno de frangos

A hidrólise de azeite de oliva e óleos de milho e soja com preparações enzimáticas de pâncreas e duodeno de frangos foi testada de acordo com o método descrito por Watanabe *et al.* (1977), modificado. Em Erlenmeyers de 125 mL foram adicionados 2,5 mL de emulsão de azeite de oliva, óleo de milho ou soja a 25% (v:v) em solução 2% (v:v) de álcool polivinílico, 2,5 mL de tampão Tris-HCl 0,1 Mol/L pH 8,0 e 1 mL de solução enzimática, posteriormente a mistura foi incubada a 45 rpm e 30 °C durante 30 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 10 mL de mistura de acetona/etanol (1:1, v:v). O teor de ácidos graxos liberados foi determinado por titulação com NaOH 0,05 N, utilizando 3 gotas de timolftaleína (0,2%) como indicador. Uma unidade de lipase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um μmol de ácido graxo por minuto nas condições do ensaio. Foram testadas as preparações enzimáticas extraídas de pâncreas e duodeno de frangos com água e agitação manual por 5 minutos; água e agitação mecânica com hélice por 1 minuto; tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L de CaCl₂ e agitação manual por 5 minutos; e tampão fosfato

0,05 Mol/L pH 7,0 e agitação mecânica com hélice por 1 minuto.

4.7. Purificação parcial da protease de pâncreas e duodeno de frangos por filtração em gel de Sephadex G-100

Uma alíquota de 3 mL de preparação enzimática de pâncreas e duodeno de frangos extraída como água destilada e agitação manual por 5 minutos e concentrada por precipitação com acetona, contendo 12.576,93 U de protease, 4.166 U de α -amilase e 5,380 U de lipase + 5 mg de Blue dextrana foi aplicada em coluna de Sephadex G-100 (2 cm Ø x 40 cm) equilibrada com solução fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0. Frações de 3 mL foram coletadas a cada 7 minutos. A eluição das proteínas foi acompanhada pela medida de absorbância a 280 nm. A atividade de protease, α -amilase e lipase nas frações eluídas foram determinadas como descrito nos itens 4.4.1, 4.4.2 e 4.4.3, respectivamente.

4.7.1 Determinação da atividade da protease parcialmente purificada de pâncreas e duodeno de frangos e preparações de enzimas comerciais em diferentes proteínas

A atividade da protease da preparação parcialmente purificada de pâncreas e duodeno de frangos, na hidrólise das proteínas albumina de ovo, caseína e vísceras de frangos foram comparadas com a atividade de proteases comerciais Neutrase[®] (*Bacillus amyloliquefaciens*), Alcalase[®] (*Bacillus licheniformis*) e Flavourzyme[®] (*Aspergillus oryzae*). Tubos de ensaio contendo 2 mL de solução 1% de albumina de ovo, caseína ou farinha de vísceras de frangos em tampão 0,1 Mol/L pH 8,0 e 1 mL de solução de protease (50 U/mL) foram incubados a 50 °C. A concentração de proteínas solúveis em ácido tricloroacético foi determinada como descrito no item 4.6.1.1.

4.7.2 Determinação do efeito do pH e temperatura na atividade e estabilidade da protease parcialmente purificada de pâncreas e duodeno de frangos utilizando planejamento experimental

4.7.2.1 Determinação dos efeitos do pH e temperatura na atividade da protease parcialmente purificada de pâncreas e duodeno de frangos, utilizando planejamento experimental

Os efeitos do pH e temperatura na atividade da protease parcialmente purificada foram determinados utilizando delineamento 2² com três repetições no ponto central e quatro pontos axiais, totalizando 11 ensaios. As variáveis independentes utilizadas foram o pH e a temperatura e a variável dependente a atividade enzimática.

Para verificar a qualidade do ajuste da equação do modelo de segunda ordem, foram utilizados os coeficientes de determinação (R^2) e o Teste F (ANOVA). As relações entre as respostas e as variáveis foram determinadas com a utilização do pacote Statistica® 13.3.

4.7.2.2.Determinação dos efeitos do pH e temperatura na estabilidade da protease parcialmente purificada de pâncreas e duodeno de frangos, utilizando planejamento experimental

Os efeitos do pH e da temperatura na estabilidade da protease parcialmente purificada foram determinados utilizando delineamento 2^2 com três repetições no ponto central e quatro pontos axiais, totalizando 11 ensaios. As variáveis independentes utilizadas foram o pH e a temperatura e a variável dependente a atividade enzimática. Os valores codificados e reais das variáveis utilizados para determinação da estabilidade foram iguais aos utilizados para a determinação do efeito do pH e temperatura na atividade da protease.

Tabela 1: Valores codificados e reais utilizados no delineamento experimental para determinação dos efeitos do pH e temperatura na atividade e estabilidade da protease parcialmente purificada de pâncreas e duodeno de frangos

Variável	Código	-1,41	-1	0	+1	+1,41
pH	x1	7,0	7,3	8,0	8,7	9,0
Temperatura (°C)	x2	45	48	55	62	65

Para avaliação da estabilidade da enzima, alíquotas da preparação purificada da protease foram mantidas a temperatura e pH determinados no planejamento fatorial (Tabela 2) por 15, 30, 45 e 60 minutos, após este período as amostras foram transferidas para banho de gelo e o pH ajustado para 8,0 pela adição de tampão fosfato 0,1 Mol/L. A atividade residual foi determinada em pH 8,0 e a 55 °C.

Tabela 2: Planejamento fatorial, valores codificados e reais das variáveis do estudo dos efeitos do pH e temperatura na estabilidade de protease parcialmente purificada de pâncreas e duodeno de frangos

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	pH	Temperatura (°C)
1	-1	-1	7,3	48
2	+1	-1	8,7	48
3	-1	+1	7,3	62
4	+1	+1	8,7	62
5	-1,41	0	7,0	55
6	+1,41	0	9,0	55
7	0	-1,41	8,0	45
8	0	+1,41	8,0	65
9	0	0	8,0	55
10	0	0	8,0	55
11	0	0	8,0	55

4.8 Estudo da aplicação das preparações de proteases de pâncreas e duodeno de frangos

4.8.1 Obtenção de hidrolisados de proteínas de arroz, ervilha, feijão fava e semente de abóbora utilizando preparações de proteases de pâncreas e duodeno de frangos

Para o estudo de obtenção de hidrolisados proteicos foram usados proteínas de arroz (84,4 g de proteína/100g), ervilha (77,8 g de proteína/100g), feijão fava (57,7 g de proteína/100g) e semente de abóbora (22 g de proteína/100g), comerciais. Os hidrolisados de proteínas de arroz, ervilha, feijão fava e semente de abóbora foram preparados de acordo com a metodologia descrita por Castro & Sato (2014) e Cavallaro (2019). Amostras de misturas de 5 g do concentrado proteico, 45 mL de tampão fosfato 0,1 Mol/L pH 8,0 e preparações de proteases (50 U por mL de mistura reacional) foram incubadas a 55 °C e 100 rpm durante 2 horas. Foram testadas as preparações de proteases parcialmente purificada de pâncreas e duodeno de frangos, protease extraída com água destilada e agitação manual por 5 minutos e precipitada com acetona e protease extraída com água destilada e agitação manual por 5 minutos e precipitada com álcool isopropílico. Posteriormente, as proteases foram inativadas em banho-maria a 100 °C por 20 min, posteriormente as misturas foram submetidas a centrifugação a 11.000 x g a 5 °C por 20 min e os sobrenadantes contendo os peptídeos foram coletados e liofilizados para as análises descritas a seguir.

4.8.1.1 Determinação das proteínas solúveis em ácido tricloroacético dos hidrolisados de proteínas de arroz, ervilha, feijão fava e semente de abóbora obtidos com preparações de proteases de pâncreas e duodeno de frangos

As proteínas solúveis em ácido tricloroacético dos hidrolisados de proteínas de arroz, ervilha, feijão e sementes de abóbora foram determinadas como descrito no item 4.6.1.1.

4.8.1.2 Avaliação da atividade antioxidante dos hidrolisados de proteínas de arroz, ervilha, feijão fava e semente de abóbora obtidos com preparações de proteases de pâncreas e duodeno de frangos

4.8.1.2.1 Avaliação da atividade antioxidante dos hidrolisados de proteínas de arroz, ervilha, feijão fava e semente de abóbora obtidos com preparações de proteases de pâncreas e duodeno de frangos pelo método de DPPH

A avaliação de eliminação de radicais DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) dos hidrolisados de proteína foi determinada conforme método descrito por Brand-Willians *et al.* (1995), com modificações (MATOS, 2020). Microtubos de 2 mL contendo a mistura de 132 µL de hidrolisado (5 mg/mL) e 268 µL de solução 0,02% de DPPH em etanol 99,5% foram incubados por 60 min à temperatura ambiente no escuro e posteriormente centrifugados a 10.000 x g durante 5 minutos. A redução do radical DPPH foi avaliada a 517 nm em leitor de microplacas (Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific, Finland). A determinação foi realizada em quadruplicata e os resultados expressos em µmol de equivalente de Trolox por grama de proteína hidrolisada (µmol TE g⁻¹).

4.8.1.2.2 Avaliação da atividade antioxidante dos hidrolisados de proteínas de arroz, ervilha, feijão fava e semente de abóbora obtidos com preparações de proteases de pâncreas e duodeno de frangos pelo ensaio FRAP: Método de redução de ferro

O ensaio FRAP baseia-se na medida da habilidade dos antioxidantes da amostra em reduzirem, em meio ácido, o complexo Fe^{3+} /tripiridiltriázina (TPTZ), e formar Fe^{2+} , de cor azul intensa e absorção máxima a 593 nm. A avaliação de FRAP foi realizada de acordo com o método descrito por Benzie & Strains (1996) modificado por Wiriyaphan *et al.* (2012). O reagente FRAP foi preparado pela mistura de 25 mL de tampão acetato 300 mMol/L (pH 3,6), 2,5 mL de solução de TPTZ (2,4,6- tripiridil-S-triazina) 10 mM (preparada em HCl 40 mM) e 2,5 mL de solução 20 mMol/L de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$. Em ambiente escuro foram adicionados 50 µL de hidrolisado (5 mg/mL) e 250 µL do reagente FRAP em microtubos de 2 mL. Os microtubos

foram agitados em vórtex e incubados durante 25 minutos a 37 °C e posteriormente centrifugados a 10.000 x *g* durante 5 minutos. A absorbância foi avaliada a 595 nm em leitor de microplacas (Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific, Finland). Para a determinação da atividade antioxidante das amostras foi construída uma curva padrão de Trolox e os resultados expressos em $\mu\text{mol TE g}^{-1}$. A determinação foi realizada em quadruplicata.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração de protease, α -amilase e lipase da preparação bruta de pâncreas e duodeno de frangos

5.1.1 Extração de proteases por homogeneização da preparação bruta de pâncreas e duodeno de frangos em água destilada e solução tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L de CaCl_2

A Tabela 3 ilustra que na extração de enzimas da preparação bruta de pâncreas e duodeno de frangos com água destilada e solução tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L de CaCl_2 , a utilização do tampão fosfato pH 7,0 adicionado de cloreto de cálcio e agitação mecânica durante 1 min., não aumentou a atividade de protease comparada com a extração com água e agitação manual durante 5 min. Foram obtidos $12.888,50 \pm 96,90$ U/g e $12.567,00 \pm 49,10$ U/g de protease na extração com a agitação manual por 5 min. com água e com solução tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L de CaCl_2 , respectivamente.

Mane *et al.* (2010) avaliaram a obtenção de uma aminopeptidase-N (APN) utilizando intestino de frangos. Foi testada a homogeneização de amostras de intestino em água destilada na proporção de 40%. Os autores observaram que a enzima obtida no extrato bruto apresentava atividade de 1 U/mg de proteína era ativada na presença de Ca^{2+} na concentração de 0,5 Mol/L.

Mane *et al.* (2011) estudaram a obtenção de aminopeptidase de 66 kDa por homogeneização de amostras de intestino de frangos em tampão fosfato de sódio 10 mMol/L pH 8,0 na proporção de 40% e observaram que a atividade obtida da enzima foi de 1 U/mg de proteína.

Rathina Raj *et al.* (2010a) analisaram a atividade de proteases obtidas por homogeneização de intestino de frangos em água destilada na proporção de 25 g de amostra para 250 mL de água destilada e homogeneização a 2.000 rpm. Os autores observaram que a atividade da protease das vísceras *in natura* era de 16,1 U/mg de proteína. Já nos testes para proteases ácidas, alcalinas e neutras foram obtidas 7, 29,7 e 31,58 U/mg de proteína, respectivamente. Os autores observaram que os melhores resultados de atividade de protease foram obtidos em pH neutro.

Rathina Raj *et al.* (2010b) em continuidade ao estudo anterior testaram a obtenção de proteases por homogeneização de intestino de frangos em água destilada pH 6,8, tampão fosfato 0,1 mol/L pH 7,0, solução 1% de NaCl pH 6,7 e solução 1% de cloreto de potássio contendo 0,1 Mol/L de Na_2EDTA . Os autores observaram que a obtenção com diferentes soluções não

promoveu resultados estatisticamente diferentes. A atividade de protease do extrato bruto foi de 25,05 U/mg de proteína.

Sarangi *et al.* (2010) avaliaram a obtenção de proteases em sistema aquoso em duas fases de polietilenoglicol e sais. As amostras de intestino de frangos foram homogeneizadas em água e posteriormente tratadas no sistema de duas fases para purificação. Os autores observaram que o extrato bruto apresentava 11,40 U/mg de proteína. Na etapa de purificação a atividade variou entre 9,9 e 84,2 U/mg de proteína, sendo que a maior atividade foi obtida para o tratamento utilizando citrato de sódio.

Srisantisaeng *et al.* (2013) estudaram a obtenção de proteases do intestino e pâncreas de frangos por homogeneização em água destilada na proporção de 1:1 (m/m) e liofilização. O extrato liofilizado apresentou 0,35 U de protease/mg de proteína.

Gené (2019) observou que os extratos brutos de pâncreas + intestino delgado e pâncreas + duodeno *in natura*, obtidos de frangos, homogeneizados em Blixer 3[®] Robot Coupé de 3,7 L apresentaram atividade de protease iguais a 740 ± 58 U/g e 1.797 ± 167 U/g, respectivamente. No presente estudo, na extração de protease de pâncreas e duodeno de frangos por homogeneização com água destilada e agitação manual por 5 min. foi obtida atividade de protease 3,35 vezes maior do que a descrita por Gené (2019).

Tabela 3: Extração de proteases da preparação bruta de pâncreas e duodeno de frangos por homogeneização em água destilada e solução tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L de CaCl₂, com agitação manual e mecânica

Método de extração das enzimas de pâncreas e duodeno de frangos	Atividade relativa de protease (U/mL)	Atividade específica de protease (U/g de proteína)	Atividade total de protease (U)	Recuperação %
Extração com água e agitação manual por 5 min.	6.012,50±45,20	12.888,50±96,90	67.834,00±510,00 ^a	100
Extração com água e agitação mecânica por 1 min.	5.897,50±60,60	12.642,00±130,00	66.537,00±684,00 ^{a,b}	98,08
Extração com tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L CaCl ₂ e agitação manual por 5 min.	5.862,50±22,90	12.567,00±49,10	66.142,00±259,00 ^b	97,50
Extração com tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L CaCl ₂ c/ agitação mecânica por 1 min.	5.822,00±99,90	12.481,00±214,00	65.691,00±1.127,00 ^b	96,84

Médias na mesma coluna seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 95% de significância.

5.1.2 Extração de protease por homogeneização da preparação bruta de pâncreas e duodeno de frangos em solução 0,9% de NaCl e solução tampão Tris-HCl 0,05 Mol/L pH 8,0

A Tabela 4 ilustra que foi obtido menor atividade de protease na extração de enzimas da preparação bruta de pâncreas e duodeno com solução 0,9% de NaCl e solução tampão Tris-HCl 0,05 Mol/L pH 8,0, sendo obtido atividade específica igual a $3.227,90 \pm 74,30$ U/g e $2.711,10 \pm 19,30$, respectivamente, comparada com a homogeneização da preparação em água destilada.

Tabela 4: Determinação da atividade de protease nas preparações enzimáticas obtidas por homogeneização da preparação bruta de pâncreas e duodeno de frangos em solução 0,9% de NaCl e solução tampão Tris-HCl 0,05 Mol/L pH 8,0

Método de extração das enzimas de pâncreas e duodeno de frangos	Atividade relativa de protease (U/mL)	Atividade específica de protease (U/g de proteína)	Atividade total de protease (U)	Recuperação %
Extração com água e agitação manual por 5 min.	$6.012,50 \pm 45,20$	$12.888,50 \pm 96,90$	$67.834,00 \pm 510,00^a$	100
Extração com solução 0,9% de NaCl e agitação manual por 5 min.	$1.505,80 \pm 34,70$	$3.227,90 \pm 74,30$	$16.989,00 \pm 391,00^b$	25,04
Extração com tampão Tris-HCl 0,05 Mol/L pH 8,0 contendo 50 mMol/L de CaCl_2 e agitação manual por 5 min.	$1.265,00 \pm 9,01$	$2.711,10 \pm 19,30$	$14.168,00 \pm 101,70^c$	21,04

Médias na mesma coluna seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 95% de significância.

5.1.3 Obtenção de proteases por homogeneização da preparação bruta de pâncreas e duodeno de frangos em água destilada ou homogeneização em solução tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L de CaCl₂ , seguido por precipitação com solventes orgânicos

A Tabela 5 ilustra que nos ensaios de extração de proteases da preparação bruta de pâncreas e duodeno com água (4 °C) e agitação manual por 5 min e posterior precipitação com acetona, etanol e álcool isopropílico foram obtidos rendimento de 77,26%, 65,04% e 63,47% , respectivamente. Enquanto que nos ensaios de extração de protease da preparação bruta de pâncreas e duodeno com tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L CaCl₂ e agitação manual por 5 min e posterior precipitação com acetona, etanol e álcool isopropílico foram obtidos 61,23%, 59,93% e 59,27% de recuperação, respectivamente. A preparação enzimática obtida por extração com água (4 °C) e agitação manual por 5 min e precipitação com acetona apresentou atividade específica de protease igual a $9.958 \pm 73,50$ U/g de proteína.

Rathina Raj *et al.* (2010b) avaliaram a obtenção de proteases por homogeneização de intestino de frangos em água destilada pH 6,8; tampão fosfato 0,1 mol/L pH 7,0; solução 1% de NaCl pH 6,7 e solução 1% de cloreto de potássio contendo 0,1 Mol/L de Na₂EDTA com posterior tratamento por solventes orgânicos (acetona, álcool isopropílico e etanol). Os autores observaram que o extrato bruto apresentou atividade de protease igual a 23,05 U/mg de proteína. Após tratamento com os solventes foi observado que as proteases alcalinas tratadas com acetona, álcool isopropílico e etanol apresentaram atividade de 24,93, 26,32 e 27,19 U/mg de proteína, respectivamente. Já para as proteases ácidas o melhor resultado foi obtido por precipitação com álcool isopropílico onde a atividade de enzima foi de 9,69 U/mg de proteína.

Gené (2019) descreveu a obtenção de protease de pâncreas + intestino delgado por homogeneização com água destilada e precipitação com acetona, álcool isopropílico e etanol e obteve 68,02, 38,76 e 26,83% de recuperação, respectivamente. Foi obtido maior recuperação da protease na extração de protease de pâncreas + intestino delgado de frangos por homogeneização com água destilada e precipitação com acetona, sendo obtido atividade específica igual a 10.704 ± 895 U/g de proteína.

Tabela 5: Obtenção de protease da preparação bruta de pâncreas e duodeno de frangos por homogeneização em água destilada e solução tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L de CaCl₂, seguido de precipitação com solventes orgânicos

Métodos de extração das enzimas de pâncreas e duodeno frangos	Atividade relativa de protease (U/mL)	Atividade específica de protease (U/g de proteína)	Atividade total de protease (U)	Recuperação %
Extração com água e agitação manual por 5 min.	6.012,50±45,20	12.888,50±96,90	67.834,00±510,00 ^a	100
Extração com água e agitação manual por 5 min., seguido de precipitação com acetona	5.641,70±41,60	9.958,80±73,50	52.415,00±387,00 ^b	77,27
Extração com água e agitação manual por 5 min., seguido de precipitação com etanol	4.749,50±54,90	8.383,90±96,80	44.126,00±510,00 ^c	65,04
Extração com água e agitação manual por 5 min., seguido de precipitação com álcool isopropílico	4.634,50±28,80	8.180,90±50,80	43.058,00±267,00 ^c	63,47
Extração com Tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L CaCl ₂ e agitação manual por 5 min., seguido de precipitação com acetona	4.469,67±8,78	7.889,97±15,50	41.536,10±81,60 ^d	61,23
Extração em Tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L CaCl ₂ e agitação manual por 5 min., seguido de precipitação com Etanol	4.375,75±17,25	7.724,20±30,50	40.653,60±160,30 ^d	59,93
Extração em Tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L CaCl ₂ e agitação manual por 5 min., seguido de precipitação com álcool isopropílico	4.327,83±14,47	7.639,60±25,50	40.208,40±134,40 ^d	59,27

Médias na mesma coluna seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 95% de significância.

De acordo com Pinheiro (2016), o processo de precipitação é uma etapa bastante conhecida e empregada nos processos de recuperação e purificação de bioprodutos. Dentre os métodos de precipitação destaca-se o uso de solventes orgânicos pelo aumento da solubilização de compostos apolares, redução de contaminação microbiana e menor custo para tratamento dos resíduos gerados em comparação com o *salting-out*, uma vez que os solventes orgânicos podem ser reciclados eficientemente por destilação (SCHUBERT, 1981; DOUKYU; OGINO, 2010; PINHEIRO, 2016).

5.1.4 Extração de α -amilase por homogeneização da preparação bruta de pâncreas e duodeno de frangos em água destilada ou solução tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L de CaCl_2

A Tabela 6 ilustra que foi obtido maior extração de α -amilase por homogeneização da preparação bruta de pâncreas e duodeno com água e agitação manual por 5 minutos, sendo obtido $540,74 \pm 1,96$ U/mL e atividade específica de $1.581,11 \pm 17,5$ U/g de proteína. A agitação mecânica com hélice por 1 minuto da amostra não aumentou a extração de α -amilase.

Buonocore *et al.* (1977) estudaram a extração de α -amilases de pâncreas de frangos com solução tampão cacodilato de sódio 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,01 Mol/L de NaCl e 0,01 Mol de CaCl_2 na proporção 1:5 (m:v) a 0 °C. Após a centrifugação o sobrenadante denominado extrato bruto apresentou 2.000 U/mL de α -amilase. A enzima foi purificada 6,1 vezes por cromatografia de afinidade em coluna Sepharose 2B ligada a inibidores de amilase de grãos de trigo, ultrafiltração em membrana PM-10 e filtração em coluna de Sephadex G-25. A α -amilase purificada apresentou atividade ótima em pH 7,5 e 37 °C.

Osman (1982) descreveu a extração de α -amilase de pâncreas e intestino de frangos da raça Fayomi de 6 a 8 meses de idade, por homogeneização das amostras em água destilada gelada na razão 1:10 (m:v), seguido de centrifugação. Uma unidade de atividade de α -amilase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de maltose a partir de amido por minutos a 37 °C. As amostras de intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo), duodeno e pâncreas apresentaram 430 U/g, 180 U/g e 22.000 U/g de α -amilase, respectivamente.

Gené (2019) verificou que os extratos brutos de pâncreas + intestino delgado e pâncreas + duodeno *in natura*, obtidos de frangos, homogeneizados em Blixer 3[®] Robot Coupé de 3,7 L apresentaram 364 ± 27 U/g e 547 ± 72 U/g, de α -amilase, respectivamente.

Tabela 6: Extração de α -amilase da preparação bruta de pâncreas e duodeno de frangos por homogeneização em água destilada ou solução tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L de CaCl_2 , com agitação manual e mecânica

Método de extração das enzimas de pâncreas e duodeno de frangos	Atividade relativa de α -amilase (U/mL)	Atividade específica de α -amilase (U/g de proteína)	Atividade Total de α -amilase (U)	Recuperação %
Extração com água e agitação manual por 5 min.	540,74 $\pm$ 1,96	1.581,11 $\pm$ 17,50	5.434,78 $\pm$ 19,75 ^a	100
Extração com água e agitação mecânica por 1 min.	533,45 $\pm$ 6,26	1.559,80 $\pm$ 18,30	5.362,42 $\pm$ 62,90 ^a	98,66
Extração com tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L CaCl_2 e agitação manual por 5 min.	485,32 $\pm$ 1,19	1.419,06 $\pm$ 26,00	4.878,61 $\pm$ 11,90 ^b	89,76
Extração com tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L CaCl_2 e agitação mecânica por 1 min.	458,26 $\pm$ 8,26	1.339,88 $\pm$ 24,10	4.606,67 $\pm$ 83,10 ^c	84,76

Médias na mesma coluna seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 95% de significância.

5.1.5 Extração de α -amilase por homogeneização da preparação bruta de pâncreas e duodeno de frangos em solução 0,9% de NaCl e solução tampão Tris-HCl 0,05 Mol/L pH 8,0 contendo 50 mMol/L de CaCl_2

Foi obtido menor atividade de α -amilase e menor rendimento na extração da enzima da preparação bruta de pâncreas e duodeno de frangos com solução 0,9% de NaCl (356,38 $\pm$ 74,1 U/g proteína) e solução Tris-HCl 0,05 Mol/L pH 8,0 contendo 50 mMol/L de CaCl_2 (313,69 $\pm$ 51,71 U/g proteína), comparada com a extração de α -amilase da preparação bruta de pâncreas e

duodeno de frangos com água destilada ($1.581,11 \pm 17,5$ U/g proteína) (Tabela 7).

Buonocore *et al.* (1977) avaliaram a purificação e caracterização de α -amilases provenientes de pâncreas de frangos. Amostras de pâncreas de frangos foram homogeneizadas em solução tampão cacodilato de sódio 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,01 Mol/L de NaCl e 0,01 Mol/L de CaCl_2 na proporção de 1:5 (m:v) a 0 °C. A amostra foi centrifugada a 20.000 x g por 2 horas a 4 °C. O sobrenadante denominado extrato bruto apresentou 2.000 U/mL de α -amilase. A α -amilase do extrato bruto foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose 2B ligada a inibidores de amilase de albumina de grão de trigo conforme descrito por Buonocore *et al.* (1975), equilibrada com tampão cacodilato de sódio 0,05 Mol/L pH 7,0, concentradas por ultrafiltração em membrana PM-10 Diaflo (Amicon Corp., Lexington, MASS., EUA) e aplicado novamente em coluna cromatográfica Sephadex G-25 equilibrada com tampão de cacodilato de sódio 0,05 Mol/L pH 7,0. Os autores verificaram que a α -amilase de pâncreas de frangos foi purificada 6,1 vezes, sendo obtido recuperação de 16% da atividade inicial. A α -amilase purificada apresentou atividade ótima em pH 7,5 e 37 °C e mostrou-se estável a 4 °C após 24 horas na faixa de pH alcalino, porém apresentou rápida redução de atividade (30 minutos) em valores de pH abaixo de 7. A α -amilase purificada foi ativada por Cl^- na concentração 0,01 Mol/L e inativada irreversivelmente pela diálise a 4 °C em água ou solução 0,1 mMol/L de sulfato de sódio.

Osman (1982) avaliou amilases presentes no pâncreas e nas diferentes partes anatômicas do intestino de frangos. Para o estudo foram coletados o pâncreas, duodeno, jejuno, íleo, ceco e cólon de frangos. O extrato enzimático foi obtido da homogeneização de cada um dos tecidos em água destilada, na proporção de 1:10 (m:v), por 3 minutos em alta velocidade. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 3.000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente. A atividade da α -amilase do sobrenadante obtido foi determinada de acordo com o método descrito por Dahlqvist (1961), com modificações. O extrato enzimático obtido de pâncreas de frangos apresentou a maior atividade α -amilase (22.000 U/g de tecido/minuto) e o extrato enzimático proveniente do jejuno apresentou 80% da atividade enzimática encontrada no intestino de frangos (3.315 a 4.550 U/g de tecido/minuto).

Tabela 7: Extração de α -amilase da preparação bruta de pâncreas e duodeno de frangos por homogeneização em solução 0,9% de NaCl e solução tampão Tris-HCl 0,05 Mol/L pH 8,0 contendo 50 mMol/L de CaCl_2

Método de extração das enzimas de pâncreas e duodeno de frangos	Atividade relativa de α -amilase (U/mL)	Atividade específica de α -amilase (U/g de proteína)	Atividade total de α -amilase (U)	Recuperação %
Extração com água e agitação manual por 5 min.	540,74 $\pm$ 1,96	1.581,11 $\pm$ 17,50	5.434,78 $\pm$ 19,75 ^a	100
Extração com solução 0,9% de NaCl e agitação manual por 5 min.	121,84 $\pm$ 2,81	356,38 $\pm$ 74,10	1.225,00 $\pm$ 12,20 ^b	22,54
Extração com tampão Tris-HCl 0,05 Mol/L pH 8,0 contendo 50 mMol/L de CaCl_2 e agitação manual por 5 min.	107,27 $\pm$ 1,96	313,69 $\pm$ 51,70	1.078,26 $\pm$ 8,50 ^c	19,84

Médias na mesma coluna seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 95% de significância.

5.1.6 Extração de lipase por homogeneização da preparação bruta de pâncreas e duodeno de frangos em água destilada e solução tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L de CaCl_2

A Tabela 8 ilustra que foi obtido maior atividade de lipase na extração da enzima da preparação bruta de pâncreas e duodeno, com água destilada, comparada com a extração utilizando solução tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L CaCl_2 . Foi obtido atividade específica de lipase 1.308,61 $\pm$ 4,70 U/g de proteína e 1.321,69 $\pm$ 8,11 U/g de proteína na homogeneização de da preparação bruta de pâncreas e duodeno em água destilada com agitação manual durante 5 minutos e agitação mecânica com hélice durante 1 minuto, respectivamente.

Gené (2019) verificou que os extratos brutos de pâncreas + intestino delgado e pâncreas + duodeno *in natura*, obtidos de frangos, homogeneizados em Blixer 3[®] Robot Coupé de 3,7 L apresentaram 92 ± 8 U/g e 214 ± 24 U/g, de lipase, respectivamente. A preparação de lipase obtida após homogeneização do extrato bruto *in natura* de pâncreas + intestino de frangos com água durante 30 segundos e posterior liofilização, apresentou atividade específica igual 608 U/g de proteína, com recuperação de 19,92% em relação ao extrato bruto inicial.

Tabela 8: Extração de lipase da preparação bruta de pâncreas e duodeno de frangos por homogeneização em água destilada e em solução tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L de CaCl₂, com agitação manual e mecânica

Método de extração das enzimas de pâncreas e duodeno de frangos	Atividade relativa de lipase (U/mL)	Atividade Específica de lipase (U/g de proteína)	Atividade Total (U)	Recuperação %
Extração com água e agitação manual por 5 min.	850,59±3,74	1.308,61±4,70	8.505,94±30,53 ^a	100
Extração com água e agitação mecânica por 1 min.	859,10±6,46	1.321,69±8,11	8.591,01±52,74 ^a	101
Extração com tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L CaCl ₂ e agitação manual por 5 min.	697,90±9,90	1.073,69±12,44	6.979,01±80,85 ^b	82,05
Extração com tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L CaCl ₂ c/ agitação mecânica por 1 min.	706,87±9,61	1.087,50±12,07	7.068,74±78,49 ^b	83,11

Médias na mesma coluna seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 95% de significância.

Madhusudhan *et al.* (1988) estudaram a obtenção de lipase a partir do pâncreas de frangos como fonte de pancreatina para o tratamento de insuficiência de enzimas pancreáticas em humanos. As amostras de pâncreas de frangos foram homogeneizadas em tampão fosfato 0,02 Mol/L pH 8 contendo 0,9% de NaCl (1:5, m:v) por 5 minutos e centrifugadas a 10.000 x g por 20 min. Os autores observaram que a lipase pode apresentar aumento de atividade em até 3 vezes conforme o vigor da homogeneização dos tecidos pancreáticos e que para a extração da lipase era necessário romper o maior número possível de células, ao contrário da extração de algumas proteases. A preparação de lipase de pâncreas de frangos extraída com tampão fosfato 0,02 Mol/L pH 8,0 contendo 0,9% de NaCl na proporção 1:5 (m:v) e precipitada com isopropanol apresenta 24 U/mg, sendo obtido rendimento de 15%.

5.1.7 Extração de lipase da preparação bruta de pâncreas e duodeno de frangos por homogeneização em solução 0,9% de NaCl e solução tampão Tris-HCl 0,05 Mol/L pH 8,0 contendo 50 mMol/L de CaCl₂

A extração da lipase por homogeneização da preparação bruta de pâncreas e duodeno de frangos com solução 0,9% de NaCl ($615,77 \pm 7,14$ U/g proteína) e solução tampão Tris-HCl 0,05 Mol/L pH 8,0 contendo 50 mMol/L de CaCl₂ ($606,13 \pm 11,13$ U/g proteína) resultou em menor atividade e baixa recuperação, comparada com a extração da lipase com água destilada ($1.308,61 \pm 4,70$ U/g proteína). O rendimento de lipase na extração da enzima com solução 0,9% de NaCl e solução tampão Tris-HCl 0,05 Mol/L pH 8,0 contendo 50 mMol/L de CaCl₂ foi de 35,83% e 35,27% respectivamente, comparado com a extração da lipase com água destilada (Tabela 9).

Fendri *et al.* (2006) estudaram a purificação e caracterização de lipase pancreática de frangos. Amostras de pâncreas congelados foram homogeneizados utilizando clorofórmio e n-butanol (4:1, v:v). Os autores observaram que a atividade de lipase do extrato bruto, utilizando o substrato tributirina e 0,004 Mol/L de NaTDC foi $95,3 \pm 7,02$ U/mg. A precipitação com sulfato de amônio 60% aumentou a atividade específica da lipase para $508,63 \pm 11,3$ U/mg (fator de purificação de $5,34 \pm 0,28$) e após todos os processos de purificação foi obtido 9.000 U/mg (fator de purificação de $94,72 \pm 6,47$).

Tabela 9: Extração de lipase da preparação bruta de pâncreas e duodeno de frangos por homogeneização em solução 0,9% de NaCl e em solução tampão Tris-HCl 0,05 Mol/L pH 8,0 contendo 50 mMol/L de CaCl₂

Método de extração das enzimas de pâncreas e duodeno de frangos	Atividade relativa de lipase (U/mL)	Atividade Específica de lipase (U/g de proteína)	Atividade Total (U)	Recuperação %
Extração com água e agitação manual por 5 min.	850,59±3,74	1.308,61±4,70	8.505,94±30,53 ^a	100
Extração com solução 0,9% de NaCl e agitação manual por 5 min.	338,67±4,81	615,77±7,14	3.048,05±35,4 ^b	35,83
Extração com tampão Tris-HCl 0,05Mol/L pH 8,0 contendo 50mMol/L de CaCl ₂ e agitação manual por 5 min.	333,37±7,50	606,13±11,13	3.000,32±55,12 ^b	35,27

Médias na mesma coluna seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 95% de significância.

5.2 Hidrólise de proteínas, amido e óleos vegetais com preparações enzimáticas de pâncreas e duodeno de frangos

5.2.1 Hidrólise de proteínas com proteases de preparações enzimáticas de pâncreas e duodeno de frangos

A Tabela 10 ilustra a hidrólise das proteínas albumina de ovo; caseína e farinha de vísceras de frangos utilizando preparações enzimáticas, estimada pela determinação de proteína solúvel em ácido tricloroacético. O teor de proteína solúvel em ácido tricloroacético (TCA) é um indicador indireto do grau de hidrólise, devido à capacidade do TCA precipitar proteínas intactas, enquanto peptídeos de baixa massa molecular e aminoácidos livres são mantidos em suspensão (KETNAWA & OGAWA, 2019; TKACZEWSKA *et al.*, 2020; MATOS, 2020).

A preparação enzimática bruta de pâncreas e duodeno de frangos extraída com água destilada gelada (4 °C) e agitação manual por 5 minutos apresentou maior atividade de hidrólise de albumina de ovo, caseína e farinha de vísceras de frangos, comparada com as preparações extraídas com água e agitação mecânica com hélice por 1 minuto; tampão fosfato 0,05 Mol/L

pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L de CaCl_2 com agitação manual por 5 minutos; tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 com agitação mecânica por 1 minuto.

As preparações enzimáticas de pâncreas e duodeno de frangos extraídas com água e agitação manual por 5 minutos e precipitadas com os solventes acetona, etanol e álcool isopropílico, obtidas na forma seca apresentaram maior atividade de hidrólise de albumina de ovo, caseína e farinha de vísceras de frangos, comparada com as preparações enzimáticas de pâncreas e duodeno de frangos extraídas com solução tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L de CaCl_2 e agitação manual por 5 minutos e precipitadas com os solventes acetona, etanol e álcool isopropílico.

Na hidrólise de albumina de ovo com as preparações enzimáticas de pâncreas e duodeno de frangos extraídas com água e agitação manual por 5 minutos e precipitadas com os solventes acetona, etanol e álcool isopropílico foram obtidos cerca de 48,96 a 49,99% de proteína solúvel em TCA, comparada com 55,50% de proteína solúvel em TCA utilizando a preparação enzimática de pâncreas e duodeno de frangos extraídas com água destilada e agitação manual durante 5 minutos, considerada como controle.

Os hidrolisados de albumina de ovo obtidas com as preparações enzimáticas de pâncreas e duodeno de frangos obtidas por extração com água e agitação manual por 5 minutos e precipitação com solventes orgânicos apresentaram maior percentual de proteína solúvel em TCA do que os hidrolisados de caseína e farinha de vísceras de frangos, indicando maior atividade de hidrólise da albumina de ovo.

Tabela 10: Hidrólise de proteínas com proteases de preparações enzimáticas de pâncreas e duodeno de frangos, estimada pela concentração de proteína solúvel em ácido tricloroacético

Preparações de enzimas de pâncreas e duodeno de frangos	Proteína solúvel em TCA (%)		
	Albumina de ovo	Caseína	Farinha de vísceras de frangos
Extração com água e agitação manual por 5 min.	55,50±0,74 ^{a;B}	45,77±0,88 ^{a;C}	59,09±0,64 ^{a;A}
Extração com água e agitação mecânica com hélice por 1 min.	43,27±1,72 ^{c;B}	43,68±1,42 ^{a,b;B}	57,02±1,15 ^{a;A}
Extração com tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L de CaCl ₂ e agitação manual por 5 min.	49,77±0,08 ^{b;A}	42,75±1,55 ^{a,b;B}	55,60±3,95 ^{a;A}
Extração com tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L de CaCl ₂ e agitação mecânica com hélice por 1 min.	48,51±0,10 ^{b;B}	41,43±0,38 ^{b,c;C}	50,14±3,95 ^{b;A}
Extração com água e agitação manual por 5 min. seguido de precipitação com acetona	49,99±0,37 ^{b;A}	37,53±0,72 ^{d;B}	38,77±0,42 ^{d,e;B}
Extração com água e agitação manual por 5 min. seguido de precipitação com etanol	49,46±0,33 ^{b;A}	35,87±1,17 ^{d,e;C}	44,95±0,91 ^{c;B}
Extração com água e agitação manual por 5 min. seguido de precipitação com álcool isopropílico	48,96±0,08 ^{b;A}	38,93±1,41 ^{c,d;C}	42,11±0,10 ^{c,d;B}
Extração com tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L CaCl ₂ seguido de agitação manual por 5 min. seguido de precipitação com acetona	40,88±0,08 ^{d;A}	34,28±0,47 ^{e,f;B}	31,07±0,18 ^{f;C}
Extração com tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L CaCl ₂ e agitação manual por 5 min. e precipitação com etanol	42,91±0,22 ^{c,d;A}	33,92±1,43 ^{e,f;C}	36,29±0,71 ^{e;B}
Extração com tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L CaCl ₂ e agitação manual por 5 min. e precipitação com álcool isopropílico	35,61±0,87 ^{e;A}	32,41±0,55 ^{f,g;B}	26,68±0,28 ^{g;C}

Letras minúsculas na mesma coluna referem-se à comparação entre os diferentes extratos enzimáticos utilizados na hidrólise das proteínas; letras maiúsculas na mesma linha referem-se à comparação entre as diferentes proteínas utilizadas na hidrólise; Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 95% de significância

5.2.2 Hidrólise de amido pela α -amilase de preparações enzimáticas de pâncreas e duodeno de frangos

As Tabelas 11 e 12 ilustram a concentração de açúcares redutores formados na hidrólise de amido pela α -amilase das preparações enzimáticas de pâncreas e duodeno de frangos, incubadas a 37 °C e 50 °C, respectivamente. As preparações enzimáticas de pâncreas e duodeno de frangos extraídas com água destilada e agitação manual por 5 minutos ou agitação mecânica por 1 minuto apresentaram maior atividade de hidrólise das amostras de amido, comparada com as preparações extraídas com solução tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L de CaCl₂ e agitação manual por 5 minutos ou agitação mecânica por 1 minuto.

Foi observado que as misturas de reação contendo amido de milho, incubadas a 37 °C e 50 °C apresentaram menor teor de açúcares redutores indicando menor susceptibilidade à ação da α -amilase de pâncreas e duodeno de frangos, comparada a hidrólise de amido de mandioca, batata, amido com alto teor de amilose, amido de milho ceroso e amido de arroz ceroso (Tabela 11 e 12).

O milho triturado é o principal ingrediente e fonte energética presente na ração de frangos. Como a α -amilase de pâncreas e duodeno de frangos apresentou menor atividade de hidrólise de amido de milho, a adição de outras enzimas amilolíticas na ração pode aumentar a digestibilidade do amido. Aderibigbe *et al.* 2020 relataram que embora a digestibilidade de amido em frangos seja relativamente alta, certa proporção de amido não é digerida no intestino e desta forma a suplementação de α -amilase na ração melhora a performance de crescimento, digestibilidade aparente dos nutrientes e atividade das enzimas digestivas de frangos alimentados com dieta de milho e soja.

Liu *et al.* (2021) descreveram a otimização da suplementação de carboidrases exógenas em dieta a base de milho e soja para frangos de 1 a 3 semanas, para a máxima digestibilidade do amido, usando digestão gastrointestinal in vitro e método de superfície de resposta. Os autores verificaram que a combinação ótima das 6 carboidrases para a dieta a base de milho e soja para frangos de 1 a 3 semanas foram 297,39 U/g de glicoamilase, 549,72 U/g de pululanase, 3,01 U/g de maltase, 1.45,73 U/g de α -amilase termoestável, 278,64 U/g α -amilase com atividade em temperatura média e 1.985,97 U/g de α -amilase ativa a baixa temperatura, estimados pela liberação de açúcares redutores e digestibilidade da matéria seca.

Foi observado maior formação de açúcares redutores nas misturas de reação contendo amido e α -amilase de pâncreas e duodeno de frangos incubadas a 50 °C (Tabela 12) do que a

37 °C (Tabela 11).

Buonocore *et al.* (1977) purificaram α -amilases de pâncreas e duodeno de frangos e observaram que a atividade ótima da enzima foi a 37 °C e pH 7,5.

Gené (2019) verificou que as α -amilases de pâncreas + intestino de frangos apresentaram maior atividade na faixa de pH 6,0 a 8,0, com atividade máxima em pH 7,0 e dois picos de atividade ótima a 35 °C e 45 °C, indicando a presença de isoenzimas.

Tabela 11: Hidrólise de amido a 37 °C pela α -amilase de preparações enzimáticas de pâncreas e duodeno de frangos e formação de açúcares redutores

Preparações de enzimas de pâncreas e duodeno de frangos	Açúcares redutores (mg/mL)					
	Amido de milho	Amido de mandioca	Amido de batata	Amido de milho com alto teor de amilose	Amido de milho ceroso	Amido de arroz ceroso
Extração com água e agitação manual por 5 min.	10,91±0,96 ^{a;B}	11,24±0,31 ^{a;B}	14,06±0,84 ^{a;A}	12,80±0,21 ^{a;A,B}	13,71±1,04 ^{a;A}	14,41±0,44 ^{a;A}
Extração com água e agitação mecânica por 1 min.	9,30±0,64 ^{b;D}	10,25±0,32 ^{b;C,D}	12,10±0,64 ^{b;A,B}	11,19±0,30 ^{b;B,C}	12,17±0,21 ^{b;A,B}	13,01±0,21 ^{b;A}
Extração com tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L de CaCl ₂ e agitação manual por 5 min.	3,48±0,32 ^{c;C}	10,12±0,26 ^{b;B}	10,56±0,44 ^{c;B}	9,86±0,84 ^{b;B}	11,12±0,22 ^{b;A,B}	12,17±0,56 ^{b;A}
Extração com tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L de CaCl ₂ e agitação mecânica por 1 min.	3,13±0,21 ^{c;D}	9,48±0,27 ^{b;B}	8,46±0,32 ^{d;B,C}	7,90±0,65 ^{c;C}	9,58±0,53 ^{c;B}	10,84±0,32 ^{c;A}

Letras minúsculas na mesma coluna referem-se à comparação entre os diferentes extratos enzimáticos utilizados na hidrólise dos amidos; letras maiúsculas na mesma linha referem-se à comparação entre os diferentes amidos utilizados na hidrólise; Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 95% de significância

Tabela 12: Hidrólise de amido a 50 °C pela α -amilase de preparações enzimáticas de pâncreas e duodeno de frangos e formação de açúcares redutores

Preparações de enzimas de pâncreas e duodeno de frangos	Açúcares redutores (mg/mL)					
	Amido de Milho	Amido de Mandioca	Amido de Batata	Amido de milho com alto teor de amilose	Amido de milho ceroso	Amido de arroz ceroso
Extração com água e agitação manual por 5 min.	13,31±5,07 ^{a,b;A}	17,27±0,43 ^{a;A}	18,49±0,98 ^{a;A}	15,90±0,24 ^{a;A}	18,34±1,22 ^{a;A}	19,17±0,52 ^{a;A}
Extração com água e agitação mecânica por 1 min.	15,69±0,84 ^{a;B}	15,94±0,43 ^{b;A,B}	15,96±0,74 ^{b;A,B}	13,74±0,36 ^{b;C}	16,28±0,25 ^{b;A,B}	17,26±0,24 ^{b;A}
Extração com tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L de CaCl ₂ e agitação manual por 5 min.	7,97±0,36 ^{b,c;C}	12,53±0,30 ^{c;B}	14,33±0,51 ^{b;A}	12,26±0,93 ^{b;B}	14,59±0,24 ^{c;A}	15,55±0,63 ^{c;A}
Extração com tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L de CaCl ₂ e agitação mecânica por 1 min.	7,44±0,18 ^{c;D}	11,81±0,31 ^{c;B}	11,32±0,37 ^{c;B}	9,89±0,72 ^{c;C}	12,17±0,59 ^{d;B}	13,81±0,36 ^{d;A}

Letras minúsculas na mesma coluna referem-se à comparação entre os diferentes extratos enzimáticos utilizados na hidrólise dos amidos; letras maiúsculas na mesma linha referem-se à comparação entre os diferentes amidos utilizados na hidrólise; Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 95% de significância

5.2.3 Hidrólise de azeite de oliva, óleo de milho e soja com lipase de preparações enzimáticas de pâncreas e duodeno de frangos

A Tabela 13 ilustra a hidrólise de azeite de oliva, óleo de milho e soja pela lipase de preparações enzimáticas de pâncreas e duodeno. As lipases das preparações enzimáticas de pâncreas e duodeno de frangos extraídas com tampão fosfato 0,05Mol/L pH 7,0 contendo 0,5mMol/L de CaCl_2 , com agitação manual durante 5 minutos apresentou maior atividade de lipase do que as preparações extraídas com água e agitação manual durante 5 minutos ou agitação mecânica por 1 minuto.

Tabela 13: Hidrólise de azeite de oliva, óleo de milho e soja com lipase de preparações enzimáticas de pâncreas e duodeno de frangos

Preparações de enzimas de pâncreas e duodeno de frangos	Atividade de lipase U/mL		
	Azeite de oliva	Óleo de milho	Óleo de soja
Extração com água e agitação manual por 5 min.	651,97±3,74 ^{b;A}	630,38±3,74 ^{b;B}	639,02±3,74 ^{b;B}
Extração com água e agitação mecânica por 1 min.	665,25±6,46 ^{b;A}	658,85±17,09 ^{a,b;A}	658,85±6,46 ^{b;A}
Extração com tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L de CaCl_2 e agitação manual por 5 min.	697,90±9,90 ^{a;A}	669,81±9,90 ^{a;B}	704,38±9,90 ^{a;A}
Extração com tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L de CaCl_2 e agitação mecânica por 1 min.	669,12±3,63 ^{b;B}	667,02±6,29 ^{a;B}	723,66±16,65 ^{a;A}

Letras minúsculas na mesma coluna referem-se à comparação entre os diferentes extratos enzimáticos utilizadas na hidrólise dos óleos; letras maiúsculas na mesma linha referem-se à comparação entre os diferentes óleos utilizados na hidrólise; Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 95% de significância

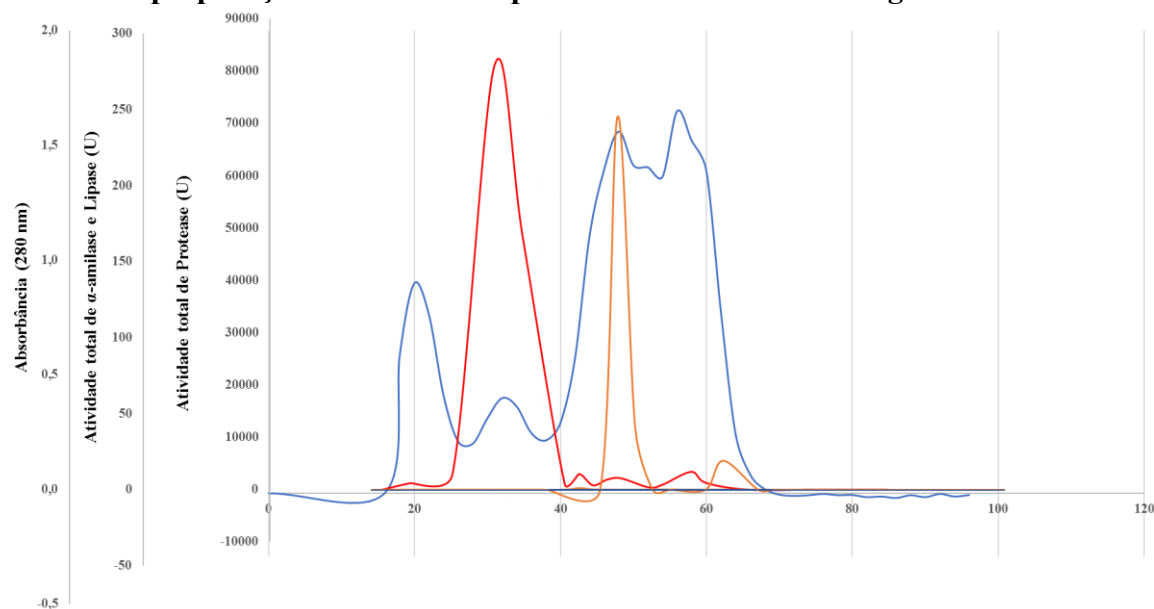
5.3 Purificação parcial da protease de pâncreas e duodeno de frangos por filtração em gel de Sephadex G-100

A Figura 4 ilustra o perfil de eluição das proteínas da preparação enzimática de pâncreas e duodeno de frangos obtida por homogeneização em água destilada, em coluna de Sephadex G-100 equilibrada em tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0. A protease foi purificada 1,9 vezes com rendimento de 16,5%. As frações nº 30 a 33 contendo atividade de protease foram reunidas e utilizadas para o estudo dos efeitos do pH e temperatura de atividade estabilidade e aplicação na hidrólise de proteína.

Guyonnet *et al.* (1999) descreveram a extração e purificação de tripsina, quimotripsina e elastase de pâncreas de frangos por cromatografia de afinidade e troca catiônica. O extrato bruto foi preparado pela incubação de 20 g de pâncreas de frangos em solução 0,5Mol/L de CaCl_2 contendo 0,02% de azida de sódio ajustado para pH 7,5, durante 9h a 25°C e em seguida ajustado para pH 8,0. As proteases do extrato bruto pâncreas de frangos foram purificadas utilizando na forma sequencial as colunas de cromatografia de afinidade Sepharose 4B-CMTI-I (inibidor de tripsina I de *Cucurbita maxima*), Sepharose 4B- BPTI (inibidor de tripsina de pâncreas bovino) e Sepharose 4B- STI (inibidor de tripsina de soja), respectivamente. A partir de 20 g de pâncreas de frangos foram obtidos 0,015 U de tripsina, 3,41 U de quimotripsina e 0,027 U de elastase purificada usando os substratos cromogênicos BapNA, SucAla₂ ProPheNA e SucAla₂ Na. Na purificação da tripsina em coluna de troca catiônica Mono S HR 5/5 foram detectadas 3 formas de tripsina com pH de atividade acima de pH 5,0 e com atividade máxima na faixa de pH 8,0 – 8,2. A quimotripsina purificada apresentou perfil similar com atividade máxima na faixa de pH 8,6 a 10. Foram observadas 2 formas de elastases com atividade em pH acima de 5,0, sendo que a elastase 1 e elastase 2 apresentaram atividade máxima em pH 8,6 e 8,2, respectivamente.

Tabela 14: Purificação de protease de pâncreas e duodeno de frangos

Preparação enzimática	mL	Atividade (U/mL)	Proteínas (mg/mL)	Atividade Total (U)	Proteínas Totais (mg)	Atividade Específica (U/mg de proteína)	Rendimento (%)	Fator de Purificação
Protease obtida por extração com água destilada e precipitação com acetona (AA)	3	4.192,31	4,7	12.576,93	14,1	891,98	100	1,0
Protease parcialmente purificada (PI)	3	692,85	0,4	2.078,55	1,2	1.732,12	16,5	1,9

Figura 4: Purificação da protease da preparação enzimática de pâncreas e duodeno de frangos em coluna de Sephadex G-100

— Absorbância
 — Atividade de protease
 — Atividade de α -amilase
 — Atividade de lipase

Mane *et al.* (2010) estudaram a obtenção e purificação de uma peptidase denominada aminopeptidase-N de intestino de frangos. A enzima foi extraída das amostras de intestino limpo de frangos por homogeneização em água destilada na proporção de 40% (m:v) em homogeneizador Polytron. Após centrifugação o sobrenadante foi precipitado com 60 a 80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e dialisado. A aminopeptidase de intestinos de frangos foi purificada 123,7 vezes até a homogeneidade, com um rendimento de 3,43% após cromatografia em coluna DEAE-sepharose, ultrafiltração em membrana YM-10 e cromatografia em coluna Phenyl-Sepharose. A enzima foi identificada como alanil-aminopeptidase ou aminopeptidase-N e apresentou atividade enzimática ótima a 60 °C e pH 6,0.

Mane *et al.* (2011) avaliaram a obtenção e purificação de uma aminopeptidase de intestinos de frangos, de massa molecular de 66 kDa, com elevada afinidade para resíduos de prolina N-terminal. Amostras de intestino limpo de frangos foram homogeneizadas com uma solução tampão fosfato de sódio 10 mMol/L em pH 8, na proporção de 40% (m:v) utilizando um homogeneizador Polytron. Após centrifugação o sobrenadante foi concentrado por precipitação com 60 a 80% de saturação e dialisado. A aminopeptidase foi purificada por cromatografia DEAE-Sepharose, ultrafiltração em membrana YM-10, cromatografia em coluna Phenyl-Sepharose, concentração por ultrafiltração, cromatografia de exclusão molecular em Superdex G-200 e concentração em tubo Centricon. A aminopeptidase purificada apresentou atividade específica igual a 1 U/mg de proteína e atividade ótima em pH 7,5 e 55°C.

5.3.1 Atividade de hidrólise de proteínas da protease parcialmente purificada de pâncreas e duodeno de frangos

A protease parcialmente purificada de pâncreas e duodeno de frangos apresentou menor atividade de hidrólise da albumina de ovo, caseína e farinha de vísceras de frangos, estimada pela determinação do percentual de proteína solúvel em TCA, comparada com proteases comerciais Neutrase® (*Bacillus amyloliquefaciens*), Alcalase® (*Bacillus licheniformis*) e Flavourzyme® (*Aspergillus oryzae*) (Tabela 15). As amostras de albumina de ovo, caseína e farinha de vísceras de frangos hidrolisadas com a protease parcialmente purificada de pâncreas e duodeno de frangos apresentaram valores de percentual de proteína solúvel em TCA iguais a $52,50 \pm 0,53\%$, $45,08 \pm 0,26\%$ e $58,40 \pm 1,20\%$, enquanto que as amostras hidrolisadas pela protease Neutrase® (*Bacillus amyloliquefaciens*) apresentaram $62,22 \pm 0,10\%$, $57,00 \pm 2,07\%$ e $64,92 \pm 1,06\%$, respectivamente.

As amostras de farinha de vísceras hidrolisadas pelas diferentes proteases

apresentaram maior percentual de proteína solúvel em TCA, comparadas com os hidrolisados de albumina de ovo e caseína.

Amaral (2022) avaliou a hidrólise de farinha de vísceras de frangos com proteases comerciais para obtenção de peptídeos com propriedades antioxidantes. No estudo foi avaliada a hidrólise enzimática utilizando o concentrado proteico da farinha de vísceras de frangos e as proteases comerciais Flavourzyme[®] e Alcalase[®], estudando variáveis do processo de hidrólise (tempo de hidrólise e concentração da mistura de enzimas). O teor de proteína solúvel em TCA para os hidrolisados de farinha de vísceras variaram entre $43,14 \pm 0,43$ e $64,93 \pm 0,26$, dependendo das condições aplicadas no planejamento experimental. Os resultados obtidos neste estudo para a hidrólise de farinha de vísceras utilizando a protease de pâncreas e duodeno e proteases comerciais estão de acordo com os resultados descritos pelo autor.

Tabela 15: Atividade de hidrólise de proteínas da protease parcialmente purificada de pâncreas e duodeno de frangos e proteases comerciais, estimada pela determinação de proteína solúvel em TCA

Protease	Proteína solúvel em TCA (%)		
	Albumina de ovo	Caseína	Farinha de Visceras
Protease de pâncreas e duodeno de frangos parcialmente purificada	52,50±0,53 ^{d;B}	45,08±0,26 ^{c;C}	58,40±1,20 ^{c;A}
Protease Neutrase [®] (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>)	62,22±0,10 ^{a;A}	57,00±2,07 ^{b;B}	64,92±1,06 ^{a;A}
Protease Alcalase [®] (<i>Bacillus licheniformis</i>)	60,64±0,13 ^{b;B}	62,14±0,57 ^{a;A}	63,13±0,62 ^{a,b;A}
Protease Flavourzyme [®] (<i>Aspergillus oryzae</i>)	58,90±0,35 ^{c;A,B}	56,31±2,37 ^{b;B}	61,39±0,86 ^{b;A}

Letras minúsculas na mesma coluna referem-se à comparação entre os hidrolisados de proteína obtidos por diferentes proteases; letras maiúsculas na mesma linha referem-se à comparação entre os hidrolisados de diferentes proteínas obtidos pela protease; Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 95% de significância.

5.3.2 Efeito do pH e temperatura na atividade e estabilidade da protease parcialmente purificada de pâncreas e duodeno de frangos

5.3.2.1 Efeitos do pH e temperatura na atividade da protease parcialmente purificada, utilizando planejamento experimental

A Tabela 16 ilustra os resultados do planejamento experimental do estudo dos efeitos das variáveis pH e temperatura na atividade da protease parcialmente purificada de pâncreas e duodeno de frangos parcialmente purificada. Foi observado maior atividade da protease nos ensaios do ponto central (55 °C e pH 8,0) e no ensaio 5 (55 °C e pH 7,0).

Tabela 16: Matriz do planejamento experimental para estudo dos efeitos do pH e temperatura na atividade da protease parcialmente purificada de pâncreas e duodeno de frangos

Ensaios	pH	Temperatura (°C)	pH	Temperatura (°C)	Atividade total da protease (U)
1	-1	-1	7,3	48	1.593,10
2	+1	-1	8,7	48	1.685,23
3	-1	+1	7,3	62	1.899,66
4	+1	+1	8,7	62	1.041,96
5	-1,41	0	7,0	55	2.032,00
6	+1,41	0	9,0	55	1.971,69
7	0	-1,41	8,0	45	1.452,38
8	0	+1,41	8,0	65	733,73
9	0	0	8,0	55	2.048,75
10	0	0	8,0	55	2.010,22
11	0	0	8,0	55	2.037,02

Devido à alta variabilidade dos processos envolvendo enzimas levou-se em consideração os parâmetros significativos que apresentaram p-valores menores do que 10% ($p < 0,1$). Dessa forma, com base nos p-valores excluiu-se os parâmetros Linear e Quadrático do pH por apresentarem valores de p insignificativos, sendo os mesmos incorporados aos resíduos para o cálculo da ANOVA. O F_{cal} obtido para a regressão foi de 20,0 sendo altamente significativo e acima do valor tabelado (3,07 (RODRIGUES & IEMMA, 2012)) e a percentagem de variação explicada (R^2) pelo modelo foi muito boa, de 94,09%, indicando que o modelo é bem alinhado aos dados experimentais.

Na Tabela 17 são apresentados os coeficientes do modelo de regressão, por meio da matriz codificada.

Tabela 17: Coeficiente de regressão, erro padrão, valor-t e p-valor do estudo dos efeitos das variáveis pH e temperatura na atividade de protease parcialmente purificada de pâncreas e duodeno de frangos

Fatores	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	Valor-t	p-valor
Média	2031,99	88,1	23,0596	2,85E-06
pH _(L)	-106,35	53,9	-1,9709	0,105796
pH _(Q)	-13,19	64,2	-0,2054	0,845363
Temperatura _(L)	-169,13	53,9	-3,1342	0,025833
Temperatura _(Q)	-467,58	64,2	-7,2801	0,000765
pH X Temperatura	-237,45	76,3	-3,1116	0,026503

Onde: (L) refere-se aos termos Lineares (X_1) e (Q) aos termos Quadráticos (X_2) dos parâmetros.

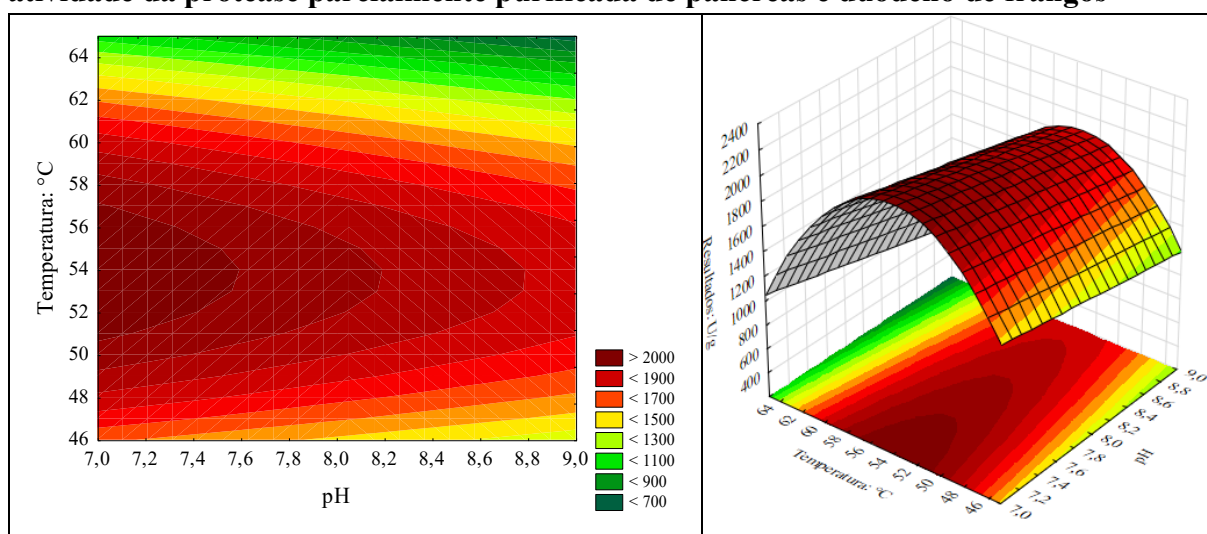
O modelo ajustado e reparametrizado é caracterizado pela seguinte equação:

$$\text{Atividade enzimática} = 2019,58 - 169,13 x_2 - 463,71 x_2^2 - 237,46 x_1 x_2$$

Após avaliação do modelo e obtenção da equação foram geradas as superfícies de resposta para avaliação do processo em função das variáveis estudadas (Figura 5).

A Figura 5 ilustra que nas condições estudadas a protease parcialmente purificada de pâncreas e duodeno de frangos apresenta maior atividade na faixa de 52 °C a 56 °C em pH 7,0. Esses resultados são similares aos descritos por Gené (2019) em que a protease de pâncreas + intestino delgado de frangos testada por delineamento experimental apresentou atividade ótima a 55,2 °C em pH 7,8, sendo que no estudo por método univariado descrito por essa autora as proteases da preparação de pâncreas + intestino delgado de frangos apresentaram maior atividade em pH alcalino na faixa de 7 a 10 e atividade ótima a 55 °C e pH 9,5.

Figura 5: Curva de contorno e superfícies de resposta dos efeitos do pH e temperatura na atividade da protease parcialmente purificada de pâncreas e duodeno de frangos



Rathina Raj *et al.* (2010a, b) avaliaram as características da protease de preparações de intestino de frangos usando o método univariado. A 37 °C, a protease apresentou maior atividade na faixa de pH 7 a 11, com picos máximos em pH 7 e 10.

Srisantisaeng *et al.* (2013) avaliaram por meio de estudo univariado a influência do pH e temperatura na atividade de proteases do extrato de intestino e pâncreas de frangos de 5 a 6 semanas. Os autores avaliaram os efeitos do pH de 6 a 9 e 37 °C e os efeitos da temperatura na faixa de 30 °C a 70 °C, com pH fixo de 7,5. As proteases apresentaram atividade ótima a 60 °C e pH 7,5.

Para validar os resultados obtidos, mais estudos são necessários a fim de determinar a faixa de pH e temperatura ótima de atividade da protease parcialmente purificada de pâncreas e duodeno de frangos.

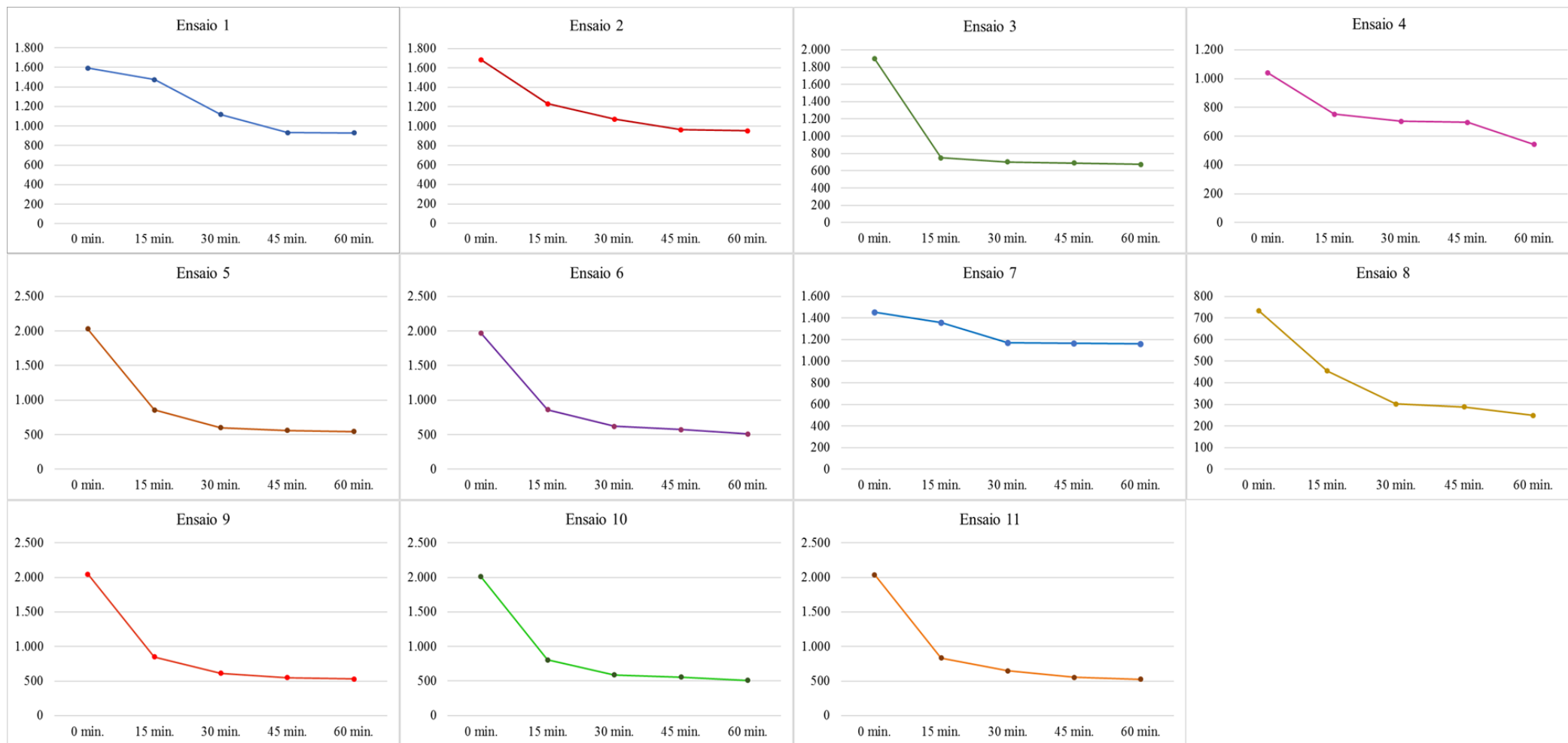
5.3.2.2 Efeitos do pH e temperatura na estabilidade da protease parcialmente purificada de pâncreas e duodeno de frangos, utilizando planejamento experimental

A Tabela 18 e a Figura 6 ilustram o planejamento experimental do estudo dos efeitos das variáveis pH e temperatura na estabilidade da protease parcialmente purificada de pâncreas e duodeno de frangos.

Tabela 18: Matriz do planejamento experimental para estudo dos efeitos do pH e temperatura na estabilidade da protease parcialmente purificada de pâncreas e duodeno de frangos

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	pH	Temperatura (°C)	Atividade total da protease (U) (0min)	Atividade total da protease (U) (15min)	Atividade total da protease (U) (30min)	Atividade total da protease (U) (45min)	Atividade total da protease (U) (60min)
1	-1	-1	7,3	48	1.593,10	1.475,00	1.116,79	932,52	929,73
2	+1	-1	8,7	48	1.685,23	1.231,26	1.072,12	963,23	952,06
3	-1	+1	7,3	62	1.899,66	748,25	700,78	689,62	672,86
4	+1	+1	8,7	62	1.041,96	753,83	703,58	695,20	541,64
5	-1,41	0	7,0	55	2.032,00	857,13	600,27	561,19	544,43
6	+1,41	0	9,0	55	1.971,69	862,72	619,82	572,35	510,93
7	0	-1,41	8,0	45	1.452,38	1.356,90	1.169,84	1.164,25	1.161,46
8	0	+1,41	8,0	65	733,73	455,09	301,53	287,57	248,49
9	0	0	8,0	55	2.048,75	851,55	614,23	550,02	530,47
10	0	0	8,0	55	2.010,22	804,09	586,31	555,60	508,14
11	0	0	8,0	55	2.037,02	834,80	647,74	554,76	524,89

Figura 6: Gráficos dos efeitos do pH e temperatura na estabilidade da protease parcialmente purificada de pâncreas e duodeno de frangos



Devido à alta variabilidade dos processos envolvendo enzimas foram considerados como parâmetros significativos os quais apresentam p-valores menores do que 10% ($p < 0,1$). Apenas os termos Linear e Quadrático da temperatura foram considerados significativos, os demais termos foram incorporados aos resíduos para o cálculo da ANOVA. O F_{cal} obtido para a regressão foi de 19,1 sendo significativo e acima do valor tabelado (3,11) (RODRIGUES & IEMMA, 2012) e a percentagem de variação explicada (R^2) pelo modelo foi de 82,72%, sendo considerado que o modelo é alinhado aos dados experimentais.

Na Tabela 19 são apresentados os coeficientes do modelo de regressão, por meio da matriz codificada.

Tabela 19: Coeficiente de regressão, erro padrão, valor-t e p-valor do estudo dos efeitos das variáveis pH e temperatura na estabilidade da protease parcialmente purificada de pâncreas e duodeno de frangos

Fatores	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	Valor-t	p-valor
Média	521,16	81,3	6,410011	0,00137
pH _(L)	-19,53	49,7	-0,39232	0,71098
pH _(Q)	42,69	59,2	0,720425	0,50352
Temperatura _(L)	-244,80	49,7	-4,91681	0,00441
Temperatura _(Q)	131,34	59,2	2,216313	0,07748
pH X Temperatura	-38,38	70,4	-0,54518	0,60905

Onde: (L) refere-se aos termos Lineares (X_1) e (Q) aos termos Quadráticos (X_2) dos parâmetros.

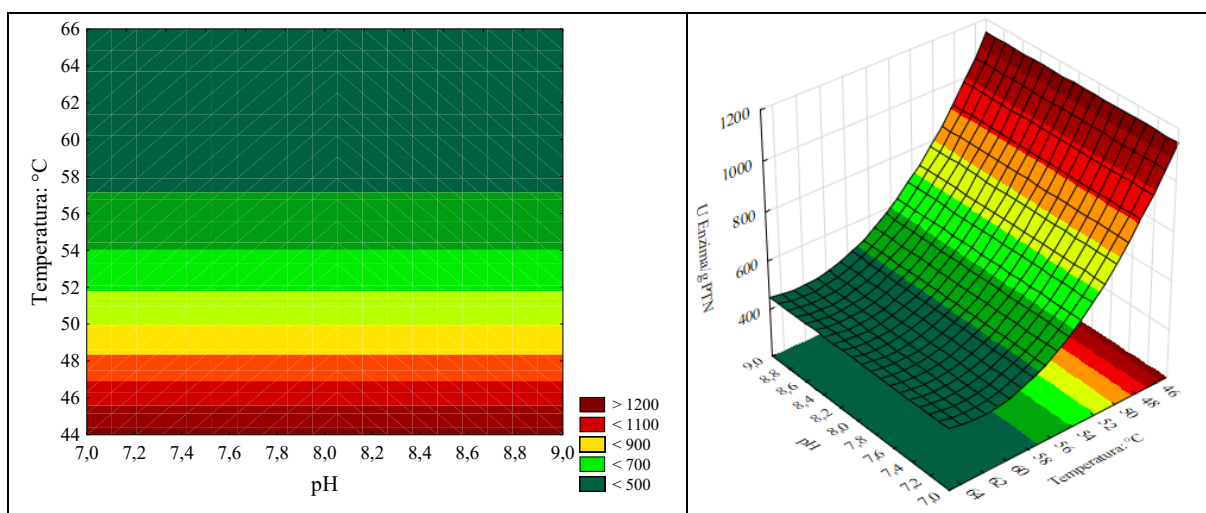
Após exclusão dos termos não significativos, os p-valores de Temperatura Linear e Quadrática passaram a ser de 0,038 e 0,056, respectivamente. O modelo ajustado e reparametrizado é caracterizado pela seguinte equação:

$$\text{Atividade enzimática} = 561,35 - 244,80 x_2 + 118,78 x_2^2$$

Em decorrência da avaliação do modelo e obtenção da equação foi possível gerar as superfícies de resposta para uma avaliação do processo em função das variáveis estudadas (Figura 7).

A Figura 7 ilustra que nas condições testadas a protease parcialmente purificada de pâncreas de frangos apresenta maior estabilidade na faixa de pH 7,0 a 9,0 em temperaturas inferiores a 48 °C.

Figura 7: Curva de contorno e superfícies de resposta dos efeitos do pH e temperatura na estabilidade da protease parcialmente purificada de pâncreas e duodeno de frangos



Srisantisaeng *et al.* (2013) avaliaram por meio de estudo univariado a influência do pH e temperatura na estabilidade de proteases do extrato de intestino e pâncreas de frangos de 5 a 6 semanas. Os autores avaliaram os efeitos do pH de 6 a 9 a 25 °C e efeitos da temperatura de 30 °C e 70 °C, com pH fixo de 7,5, na estabilidade da protease no período de 0 a 12 horas. A protease reteve aproximadamente 100% da atividade após 12 horas de incubação na faixa de pH entre 6 e 8 a 25 °C, enquanto que em pH 9 a enzima reteve 60% da atividade inicial após 12 horas. A protease reteve aproximadamente 90% da atividade inicial após incubação a 30 °C em pH 6 a 9 durante 12 horas. Após 12 horas de tratamento a 40 e 50 °C a protease perdeu 30% e 90% da atividade inicial, respectivamente. O tratamento térmico da protease em temperaturas superiores a 60 °C e pH 7,5 resultaram em perda total da atividade após 30 minutos de incubação.

Gené (2019) verificou por delineamento experimental que as proteases da preparação de pâncreas + intestino delgado de frangos apresentaram estabilidade na faixa de pH 6 a 9 e 35 °C a 47,5 °C durante 1 hora.

5.4 Aplicação das preparações de proteases de pâncreas e duodeno de frangos

5.4.1 Obtenção de hidrolisados de proteínas de arroz, ervilha, feijão fava e semente de abóbora utilizando preparações de proteases de pâncreas e duodeno de frangos

5.4.1.1 Teor de proteína solúvel em ácido tricloroacético dos hidrolisados de proteínas de arroz, ervilha, feijão fava e semente de abóbora

Na Tabela 20 estão apresentados os resultados de concentração de proteína solúvel em ácido tricloroacético dos hidrolisados de proteínas de arroz, ervilha, feijão fava e semente de abóbora obtidos com as proteases de pâncreas e duodeno de frangos parcialmente purificada e proteases das preparações enzimáticas extraídas com água e precipitação com acetona e álcool isopropílico. Os resultados são apresentados utilizando duas análises estatísticas, sendo o primeiro comparando os resultados de cada fonte de proteína para as diferentes enzimas e o segundo comparando uma enzima para diferentes fontes de proteínas.

Tabela 20: Concentração de proteína solúvel em ácido tricloroacético dos hidrolisados de proteínas de semente de abóbora, arroz, ervilha, feijão fava obtidos com preparações de proteases de pâncreas e duodeno de frangos

Preparação de Protease	Proteína solúvel em TCA (%)			
	Proteína de semente de abóbora (SA)	Proteína de arroz (PA)	Proteína de ervilha (PE)	Proteína de feijão fava (FF)
Protease parcialmente purificada (PI)	50,36±6,33 ^{a;A}	12,26±0,60 ^{a;C}	31,98±0,64 ^{a;B}	27,27±4,17 ^{a;B}
Proteases obtidas por extração com água destilada e precipitação com acetona (AA)	50,77±3,36 ^{a;A}	10,18±0,30 ^{b;C}	28,36±0,39 ^{b;B}	25,86±0,35 ^{a,b;B}
Proteases obtidas por extração com água destilada e precipitação com álcool isopropílico (AI)	37,27±0,93 ^{b;A}	10,91±0,44 ^{b;C}	18,03±0,37 ^{c;B}	20,43±2,53 ^{b;B}

Letras minúsculas na mesma coluna referem-se à comparação entre diferentes enzimas utilizadas na obtenção dos hidrolisados com atividade antioxidante; letras maiúsculas na mesma linha referem-se à comparação entre as diferentes proteínas utilizadas na obtenção dos hidrolisados; Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 95% de significância.

A Tabela 20 ilustra que os hidrolisados de proteína da semente da abóbora obtidos com proteases de pâncreas e duodeno de frangos apresentaram maiores valores de percentual de proteína solúvel em ácido tricloroacético, comparado com os hidrolisados de proteínas de arroz, ervilha e feijão fava. Os hidrolisados de proteína da semente da abóbora, arroz, ervilha e feijão fava obtidos com a protease parcialmente purificada de pâncreas e duodeno de frangos apresentaram $50,36 \pm 6,33$, $12,26 \pm 0,60$, $31,98 \pm 0,64$ e $27,27 \pm 4,17$ de percentual de proteína solúvel em ácido tricloroacético respectivamente.

5.4.1.2 Atividade antioxidante dos hidrolisados de proteínas de arroz, ervilha, feijão e semente de abóbora obtidos com protease de pâncreas e duodeno de frangos

5.4.1.2.1 Capacidade de eliminação de radical DPPH

Na Tabela 21 são apresentados os resultados referentes a avaliação da capacidade antioxidante dos hidrolisados frente ao radical DPPH. As análises da atividade antioxidante utilizando radical DPPH é baseada na transferência de elétrons, na qual ocorre a captura do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazina. À medida que os elétrons do radical tornam-se pareados pela presença de compostos antioxidantes, pode ocorrer mudança na cor do reagente de violeta para amarelo, com consequente redução da absorbância (WOLLINGER *et al.*, 2016).

Os hidrolisados de proteínas de feijão fava obtidos com proteases de pâncreas e duodeno de frangos apresentaram maior atividade antioxidante, estimada pelo ensaio do radical DPPH, comparado com os hidrolisados de proteínas de semente de abóbora, arroz e ervilha (Tabela 21). Os hidrolisados de proteínas de feijão fava obtidos com a protease parcialmente purificada de pâncreas e duodeno de frangos (50 U/g) apresentaram $2.549,00 \pm 23,31 \mu\text{mol TE g}^{-1}$, enquanto que os hidrolisados de proteína de semente de abóbora, arroz e ervilha apresentaram $721,50 \pm 164,7$, $1.157,48 \pm 20,7$ e $563,00 \pm 33,0 \mu\text{mol TE g}^{-1}$, respectivamente.

Os hidrolisados obtidos com as proteases de pâncreas e duodeno de frangos apresentaram atividade antioxidante significativamente maior em relação aos controles sem hidrólise, para todas as fontes de proteína.

Tabela 21: Atividade antioxidante estimada pelo método de DPPH dos hidrolisados de proteínas de semente de abóbora, arroz, ervilha e feijão fava obtidos com preparações de proteases de pâncreas e duodeno de frangos

Preparação de Protease	Atividade Antioxidante ($\mu\text{mol TE g}^{-1}$)			
	Proteína de semente de abóbora (SA)	Proteína de arroz (PA)	Proteína de ervilha (PE)	Proteína de feijão fava (FF)
Controle sem hidrólise	333,61 $\pm$ 42,60 ^{b;B}	494,86 $\pm$ 36,10 ^{d;A}	108,86 $\pm$ 17,68 ^{c;C}	512,11 $\pm$ 17,59 ^{b;A}
Protease parcialmente purificada (PI)	721,50 $\pm$ 164,70 ^{a;B}	1.157,48 $\pm$ 20,7 ^{a;A,B}	563,00 $\pm$ 33,0 ^{a;B}	2.549,00 $\pm$ 23,31 ^{a;A}
Proteases obtidas por extração com água destilada e precipitação com acetona (AA)	837,86 $\pm$ 12,34 ^{a;C}	928,11 $\pm$ 1,7 ^{b;B}	512,11 $\pm$ 3,6 ^{b;D}	3.401,10 $\pm$ 38,6 ^{a;A}
Proteases obtidas por extração com água destilada e precipitação com álcool isopropílico (AI)	703,11 $\pm$ 8,9 ^{a;C}	770,10 $\pm$ 25,3 ^{c;B}	472,61 $\pm$ 4,1 ^{b;D}	909,87 $\pm$ 6,4 ^{a;A}

Letras minúsculas na mesma coluna referem-se à comparação entre diferentes enzimas utilizadas na obtenção dos hidrolisados com atividade antioxidante; letras maiúsculas na mesma linha referem-se à comparação entre as diferentes proteínas utilizadas na obtenção dos hidrolisados com atividade antioxidante; Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 95% de significância

5.4.1.2.2 Capacidade antioxidante redutor férrico (FRAP)

Na Tabela 22 estão apresentados os resultados referentes a avaliação da capacidade antioxidante dos hidrolisados na reação redox na qual o complexo férrico (Fe^{3+}) é reduzido à forma ferrosa azul (Fe^{2+}) pela ação de um agente redutor (antioxidante) (LIU *et al.*, 2017).

Tabela 22: Atividade antioxidante estimada pelo método FRAP dos hidrolisados de proteínas de semente de abóbora, arroz, ervilha e feijão fava obtidos com preparações de proteases de pâncreas e duodeno de frangos

Atividade Antioxidante ($\mu\text{mol TE g}^{-1}$)				
Preparação de Protease	Proteína de semente de abóbora (SA)	Proteína de arroz (PA)	Proteína de ervilha (PE)	Proteína de feijão fava (FF)
Controle sem hidrólise	195,92 $\pm$ 4,48 ^{c;B}	177,80 $\pm$ 6,30 ^{c;B}	141,50 $\pm$ 5,07 ^{c;B}	1.734,38 $\pm$ 127,50 ^{b;A}
Protease parcialmente purificada (PI)	797,2 $\pm$ 48,8 ^{b;B}	308,90 $\pm$ 145,2 ^{b;C}	438,70 $\pm$ 69,1 ^{a;B}	4.314,00 $\pm$ 220,1 ^{a;A}
Proteases obtidas por precipitação com acetona (AA)	887,6 $\pm$ 70,1 ^{a;B}	719,38 $\pm$ 15,6 ^{a;B;C}	490,30 $\pm$ 79,6 ^{a;C}	4.293,00 $\pm$ 212,0 ^{a;A}
Proteases obtidas por precipitação com álcool isopropílico (AI)	784,76 $\pm$ 12,1 ^{b;B}	664,20 $\pm$ 92,3 ^{a;B}	297,10 $\pm$ 104,4 ^{b;C}	4.579,80 $\pm$ 181,7 ^{a;A}

Letras minúsculas na mesma coluna referem-se à comparação entre diferentes enzimas utilizadas na obtenção dos hidrolisados com atividade antioxidante; letras maiúsculas na mesma linha referem-se à comparação entre as diferentes proteínas utilizadas na obtenção dos hidrolisados com atividade antioxidante; Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 95% de significância

Os hidrolisados obtidos com as proteases de pâncreas e duodeno de frangos apresentaram atividade antioxidante significativamente maior em relação aos controles sem hidrólise, para todas as fontes de proteína.

Os hidrolisados de feijão fava obtidos com proteases de pâncreas e duodeno de frangos apresentaram maior atividade antioxidante, estimados pelo ensaio FRAP, comparado com os hidrolisados de proteínas de semente de abóbora, arroz e ervilha. Os hidrolisados de proteínas de feijão fava obtidos com protease parcialmente purificada de pâncreas e duodeno de frangos (50 U/g) apresentaram $4.314,00 \pm 220,10 \mu\text{mol TE g}^{-1}$, enquanto que os hidrolisados de proteína de semente de abóbora, arroz e ervilha apresentaram $797,2 \pm 48,80$, $308,90 \pm 145,20$ e $438,70 \pm 69,10 \mu\text{mol TE g}^{-1}$, respectivamente.

Cavallaro (2019) avaliou a obtenção de peptídeos com atividade biológica por meio da hidrólise enzimática de proteínas concentradas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) aplicando

planejamento de mistura de enzimas (Flavourzyme® 500 L; Alcalase® 2,4 L; e Neutrase® 0,8 L) para a hidrólise. No estudo a atividade antioxidante foi avaliada pelos métodos de ABTS; FRAP e ORAC. Os melhores resultados de atividade antioxidante foram obtidos para os hidrolisados preparados com $\frac{1}{3}$ de Flavourzyme® ; $\frac{1}{3}$ Alcalase® ; e $\frac{1}{3}$ Neutrase®, sendo obtidos 113,91 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ para o método ABTS, 27,90 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ para o método FRAP e 825,2 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ para o método ORAC.

Santos (2017) testou a produção, purificação, caracterização e aplicação de protease de *Bacillus licheniformis* na hidrólise das proteínas de arroz e ervilha. Para a hidrólise foram utilizadas a protease parcialmente purificada de *Bacillus licheniformis* LBA 46 e a protease comercial Alcalase® 2,4L, tendo como variáveis independentes o pH (6-10) e a concentração de protease (50-150 U/mL). Os hidrolisados da proteína de ervilha obtidos com a protease de *Bacillus licheniformis* LBA 46 apresentaram atividade antioxidante para DPPH, ORAC e FRAP iguais a 3,64, 568,7 e 9,18 $\mu\text{Mol TE g}^{-1}$, respectivamente. Os hidrolisados da proteína de ervilha obtidos com Alcalase® 2,4L apresentaram atividade antioxidante para DPPH, ORAC e FRAP iguais a 3,77, 719,67 e 9,17 $\mu\text{Mol TE g}^{-1}$, respectivamente. Em comparação com a proteína de ervilha não hidrolisada, a atividade antioxidante estimada pelo método de DPPH (8,04 $\mu\text{Mol TE g}^{-1}$) e FRAP (25,07 $\mu\text{Mol TE g}^{-1}$) foi reduzida. Mas, a atividade antioxidante medida pelo ensaio ORAC, após otimização, foi maior que a atividade para a proteína intacta (77,61 $\mu\text{Mol TE g}^{-1}$), sendo observado um aumento de 7,33 e 9,27 vezes para a protease de *Bacillus licheniformis* LBA 46 e a protease comercial Alcalase® 2,4L, respectivamente. Para os hidrolisados de proteína de arroz obtidos com *Bacillus licheniformis* LBA 46 a atividade antioxidante para ORAC e FRAP foram 940 e 18,78 $\mu\text{Mol TE g}^{-1}$, respectivamente. Os hidrolisados de proteína de arroz preparados com Alcalase® 2,4L apresentaram atividade antioxidante para ORAC e FRAP iguais a 1.001,94 e 19,31 $\mu\text{Mol TE g}^{-1}$, respectivamente. As atividades antioxidantes aumentaram quando comparados à proteína de arroz não hidrolisada: 324,97 $\mu\text{Mol TE g}^{-1}$ (ORAC) e 6,14 $\mu\text{Mol TE g}^{-1}$ (FRAP). Para a hidrólise realizada com a protease de *Bacillus licheniformis* LBA 46, houve um aumento de 2,9 vezes para ORAC e 3,05 vezes para o ensaio FRAP. Para a hidrólise realizada com Alcalase® 2,4L, houve um aumento da atividade antioxidante de 3,08 vezes para ORAC e 3,14 vezes para o ensaio FRAP. Os resultados de atividade antioxidante dos hidrolisados de proteína de arroz e ervilha obtidos com proteases de pâncreas e duodeno de frangos neste estudo foram maiores que a atividade antioxidante dos hidrolisados dessas proteínas com proteases de *Bacillus licheniformis* LBA 46 e Alcalase® 2,4L, descritos por Santos (2017).

Felix *et al.* (2021) testaram a atividade antioxidante em emulsões preparadas com

hidrolisados concentrados de feijão fava em pH 3,0, 5,0 e 8,0. Foram avaliados dois tipos de hidrolisados para a composição das emulsões, sendo essas com baixo e alto teor de hidrólise da proteína de feijão fava. A atividade antioxidante foi avaliada de acordo com os métodos de FRAP e ORAC, em três momentos do processo, inicialmente avaliou-se a atividade no primeiro dia de preparo da emulsão, posteriormente a atividade foi avaliada após 15 dias e após simulação *in vitro* de digestão gastrointestinal. Os autores relataram que os melhores resultados de atividade antioxidante foram obtidos para a emulsão preparada com hidrolisado de proteína de feijão com menor grau de hidrólise, sendo que para os métodos de FRAP e ORAC foram obtidas atividades de $1.108,6 \pm 3,8$ e $1.159,9 \pm 20,5 \mu\text{Mol TE g}^{-1}$, respectivamente. Os dados relatados pelos autores são inferiores aos obtidos nos experimentos realizados no presente estudo.

Os hidrolisados de feijão fava obtidos com proteases de pâncreas e duodeno de frangos apresentaram cerca de 20,43 a 27,83 % de proteína solúvel em TCA.

A proteína solúvel em TCA é utilizada para quantificar o grau de proteólise de hidrolisados, pois tem correlação positiva com o grau de hidrólise. Embora o tamanho do peptídeo influencie a atividade antioxidante dos hidrolisados, a geração de peptídeos com aminoácidos que apresentem resíduos livres que permitem a doação de elétrons/íons metálicos está diretamente relacionada à especificidade da protease e a fonte de proteína envolvida no processo (CASTRO & SATO, 2015). O aumento do grau de hidrólise pode aumentar as atividades biológicas do hidrolisado, como a atividade antioxidante, porém o efeito pode ser contrário ao esperado (OLAGUNJU *et al.* (2018); MAHDAVI-YEKTA *et al.* (2019)).

Amaral (2022) avaliou a hidrólise de farinha de vísceras de frangos para obtenção de peptídeos com propriedades antioxidantes. Ao avaliar o potencial antioxidante dos hidrolisados de farinhas de vísceras pelos métodos de ABTS; DPPH e FRAP, foi observado que apesar de maiores concentrações de enzimas e tempo de hidrólise resultarem em maior grau de hidrólise, estimado pelo resultado da proteína solúvel em TCA, a hidrólise não gerou resposta correlacionada entre proteína solúvel em TCA com a atividade antioxidante, exceto pela atividade antioxidante obtida pelo método FRAP que demonstrou uma correlação significativa ($p < 0,05$) com a alteração na proteína solúvel em TCA.

6 CONCLUSÃO

No estudo da extração de enzimas da preparação bruta de pâncreas e duodeno de frangos utilizando 1) água destilada (4 °C) e agitação manual por 5 minutos, 2) água destilada (4 °C) e agitação mecânica por 1 minuto, 3) tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L de CaCl_2 e agitação manual por 5 minutos, 4) tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L de CaCl_2 e agitação mecânica por 1 minuto, 5) solução 0,9% de NaCl e 6) tampão Tris-HCl 0,05 Mol/L pH 8,0 contendo 50 mMol/L de CaCl_2 foi obtido maior extração de proteases, α -amilases e lipases usando água destilada gelada (4 °C) e agitação manual por 5 minutos, sendo obtida atividade específica igual a $12.888,50 \pm 96,90$ U/g $1.581,11 \pm 15,50$ U/g e $1.308,61 \pm 4,74$ U/g de proteína, respectivamente.

As soluções de NaCl 0,9% e tampão Tris-HCl 0,05 Mol/L pH 8,0 contendo 50 mMol/L de CaCl_2 não foram eficientes para a extração de enzimas da preparação bruta de pâncreas e duodeno de frangos, sendo obtido respectivamente 25,04 % e 21,04% de recuperação de protease, 22,54% e 19,84% de α -amilases e 35,83% e 35,27% de lipases, quando comparadas com a extração com água destilada (4 °C) e agitação manual por 5 minutos.

As preparações enzimáticas de pâncreas e duodeno de frangos, obtidas na forma seca, por extração com água destilada (4 °C) e agitação manual por 5 minutos, seguido de precipitação com acetona apresentaram maior atividade de protease ($9.958,80 \pm 73,50$ U/g de proteína e recuperação de 77,27%), quando comparadas com as amostras extraídas com água destilada (4 °C) e agitação manual por 5 minutos, seguido de precipitação com etanol ou álcool isopropílico, que apresentaram $8.383,90 \pm 96,80$ U/g e $8.180,90 \pm 50,80$ U/g de protease e recuperação de 65,04% e 63,47%, respectivamente.

As preparações enzimáticas de pâncreas e duodeno de frangos, obtidas na forma seca, por extração com tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 7,0 contendo 0,5 mMol/L de CaCl_2 e agitação manual por 5 minutos, seguido de precipitação com acetona, etanol ou álcool isopropílico apresentaram atividade específica $7.889,97 \pm 15,50$ U/g, $7.724,20 \pm 30,50$ U/g e $7.639,60 \pm 25,50$ U/g de protease e recuperação de 61,23 %, 59,93 % e 59,27%, respectivamente.

Os hidrolisados de albumina de ovo obtidos com proteases de preparações enzimáticas de pâncreas e duodeno de frangos extraídas com água (4 °C) e agitação manual por 5 minutos e precipitadas com os solventes acetona, etanol ou álcool isopropílico apresentaram maior percentual de proteína solúvel em TCA ($48,96 \pm 0,08$ a $49,99 \pm 0,37\%$), comparada com os hidrolisados de caseína ($35,87 \pm 1,17$ a $38,93 \pm 1,41\%$) e farinha de vísceras de frangos ($38,77 \pm 0,42$ a $44,95 \pm 0,91\%$), indicando que a albumina de ovo foi hidrolisada de forma mais

eficiente que a caseína e farinha de vísceras de frangos.

Na temperatura de 37 °C o amido de milho apresentou menor susceptibilidade às α -amilases das preparações de pâncreas e duodeno de frangos, comparado com os amidos de mandioca, batata, amido de milho com alto teor de amilose, amido de milho ceroso e amido de arroz ceroso.

As preparações enzimáticas de pâncreas e duodeno de frangos apresentaram maior atividade de α -amilases a 50 °C do que a 37 °C.

As preparações enzimáticas de pâncreas e duodeno de frangos mostraram atividade de lipase similar na hidrólise de azeite de oliva, óleo de milho e óleo de soja.

A protease de pâncreas e duodeno de frangos, parcialmente purificada por filtração em gel Sephadex G-100 apresentou menor atividade de hidrólise da albumina de ovo e caseína, estimada pelo percentual de proteína solúvel em TCA, quando comparada com proteases microbianas comerciais Neutrase® (*Bacillus amyloliquefaciens*), Alcalase® (*Bacillus licheniformis*) e Flavourzyme® (*Aspergillus oryzae*).

A protease de pâncreas e duodeno de frangos, parcialmente purificada por filtração em gel Sephadex G-100 apresentou maior atividade da protease nos ensaios na faixa de 54 a 56 °C em pH 7,0 e maior estabilidade na faixa de pH 7,0 a 9,0 em temperaturas inferiores a 48 °C.

Os hidrolisados de proteína da semente da abóbora obtidos com proteases de pâncreas e duodeno de frangos apresentaram maior percentual de proteína solúvel em TCA, comparado com os hidrolisados de proteínas de arroz, ervilha e feijão fava.

Os hidrolisados de proteínas de feijão fava obtidos com proteases de pâncreas e duodeno de frangos apresentaram maior atividade antioxidante, estimada pelo ensaio do radical DPPH e método de FRAP, comparado com os hidrolisados de proteínas de semente de abóbora, arroz e ervilha.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRA—Associação Brasileira de Reciclagem Animal. **II Diagnóstico da indústria brasileira de reciclagem animal**. Disponível em: <<https://abra.ind.br/abra/wp-content/uploads/2020/06/II-Diagn%C3%B3stico.pdf>> Acesso em: 10 de Dezembro de 2020.

ADERIBIGBE, A., COWIESON, A.J., SORBARA, J.O., ADEOLA, O. Growth phase and dietary α -amylase supplementation effects on nutrient digestibility and feedback enzyme secretion in broiler chickens. **Poultry Science**. v.99, n.12, p.6867–6876, 2020.

ALUKO, R. E. **Functional Foods and Nutraceuticals**. New York, NY: Springer New York, 2012.

AMARAL, Y. M. S. Explorando o potencial das proteínas de vísceras de frango: uma abordagem direcionada à obtenção de produtos com propriedades antioxidantes e enzimas. **Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos)** – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2022.

BELL, D. D.; WEAVERJR, W. D; Anatomy of the Chicken. P41-58. In: **Commercial chicken meat and egg production**. 5a edição. Springer, 2002.

BENZIE, I. F. F., & STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v.239, n.1, p.70-76, 1996.

BEZERRA, R. S.; LINS, E. F. J.; ALENCAR, R. B.; PAIVA, P. M. G.; CHAVES, M. E. C.; COELHO, L. C. B. B. Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1829-1834, 2005.

BHASKAR, N.; SATHISHA, A. D.; SACHINDRA, N. M.; SAKHARE, P. Z.; MAHENDRAKAR, N. S. Effect of acid ensiling on stability of visceral waste proteases of Indian major carp, Labeorohita. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 16, p. 73-86, 2007.

BOSC-BIERNE, I.; RATHELOT, J.; PERROT, C.; SARDA, L. Studies on chicken pancreatic lipase and colipase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.794, n.1, p.65-71, 1984.

BOUDRY, C.; BAUDOUIN, C.; MOURIAUX, F. International publication trends in dry eye

disease research: A bibliometric analysis, **The Ocular Surface**, v.16, p.173–179, 2018.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. **Projeções do Agronegócio: Brasil2019/20a 2029/30 projeções delongo prazo**. Diário Oficial da União. Brasília, 2020.

BUONOCORE, V.; POERIO, E.; GRAMENZI, F.; SILANO, V. Affinity column purification of amylases. On protein inhibitors from wheat kernel. **Journal of Chromatography**, 114, p.109-114,1975.

BUONOCORE, V.; DEPONTE, R.; GRAMENZI, F.; PETRUCCI, T.; POERIO, E.; SILANO, V. Purification and properties of α -amylase from chicken (*Gallus L.*) pancreas. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 17, n. 1, p.11-16, 1977.

CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Synergistic effects of agroindustrial wastes on simultaneous production of protease and α -amylase under solid state fermentation using a simplex centroid mixture design. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 813-821, 2013.

CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Advantages of an acid protease from *Aspergillus oryzae* over commercial preparations for production of whey protein hydrolysates with antioxidant activities. **Journal of Food Processing**, v.3, p.58-65, 2014.

CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. **Food Research International**, v. 74, p. 185–198, 2015.

CAVALLARO, G. Estudo da hidrólise enzimática da proteína concentrada de feijão (*Phaseolus vulgaris L.*) para obtenção de peptídeos bioativos. **Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos)** - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2019.

CHARNEY, J. & TOMARELLI, R. M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 170, n. 23, p. 501-505, 1947.

CUPP-ENYARD. Sigma's non-specific protease activity assay – casein a substrate. **Journal of Visualized Experiments**, v.19, p.1-3, 2008.

DAHLQVIST, A. The location of carbohydrases in the digestive tract of the pig. **Biochemical Journal**, v. 78, n. 2, p. 282, 1961.

DAMLE, M. V.; HARIKUMAR, P.; JAMDARS. N. Debittering of protein hydrolysates using immobilized chicken intestinal mucosa. **Process Biochemistry**, v.45, n. 7, p.1030-1035, 2010a.

DAMLE, M. V.; HARIKUMAR, P.; JAMDARS. N. Chicken intestine: A source of aminopeptidases. **Science Asia**, v. 36, p. 137-141, 2010b.

DONG, S.; ZENG, M.; WANG, D.; LIU, Z.; ZHAO, Y.; YANG, H. Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). **Food Chemistry**. v. 107, p. 1485-1493, 2008.

DONG, X. P.; ZHU, B. W.; ZHAO, H. X.; ZHOU, D. Y.; WU, H. T.; YANG, J. F. Preparation and in vitro antioxidant activity of enzymatic hydrolysates from oyster (*Crassostrea talienwhannensis*) meat. **International Journal of Food Science and Technology**. v. 45, p. 978-984, 2010.

EBRAHIMI, S.; SOLTANI, A.; HASHEMY, S. I. Oxidative stress in cervical cancer pathogenesis and resistance to therapy. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, p. 6868–6877, 2019.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Estatísticas - Frangos e Suínos**. Brasília, DF. 2020. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas/frangos/mundo>>. Acesso em: 15 de Dezembro de 2020.

FELIX, M.; CERMEÑO, M.; FITZGERALD, R. J. Structure and *in vitro* bioactive properties of O/W emulsions generated with fava bean protein hydrolysates. **Food Research International**. v. 150, Part A, 2021.

FENDRI, A.; FRIKHA, F.; MOSBAH, H.; MILED, N.; NACIMZOUARI, N.; BACHA, A. B.; SAYARI, A.; MEJDOUB, H.; GARGOURI, Y. Biochemical characterization, cloning, and molecular modelling of chicken pancreatic lipase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.451, p. 149-159, 2006.

GENÉ, L. A. Obtenção, caracterização de preparações de proteases, α -amilases e lipases pancreáticas e intestinais de frangos. **Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos)** – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2019.

GILDBERG, A. Enzymes and bioactive peptides from fish waste related to fish silage, fish feed and fish sauce production. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v.13, p. 3-11, 2004.

GO, V. L. W.; DIMAGNO, E. P.; JERRY, D.; GARDNER, J. D.; LEBENTHAL, E.; REBER, H.; SCHEELEG, A. The Pancreas Biology, Pathobiology and Disease. 2ª edição, **Raven Press**, p. 219-247, 1993.

GUYONNET, V.; TLUSCIK, F.; LONG, P. L.; POLANOWSKI, A.; TRAVIS, J. Purification and partial characterization of the pancreatic proteolytic enzymes trypsin, chymotrypsin and elastase from the chicken. **Journal of Chromatography A**, v. 852, n.1, p.217-225, 1999.

GUYTON, C. A.; HALL, E. J. **Tratado de Fisiologia Médica**. Editora Guanabara Koogan S.A., 10ª edição, 2002, p. 693-699.

GRAND VIEW RESEARCH. **Protein Hydrolysate Market Size, Share & Trends Analysis Report by Application, by Process, by Product, by Region, And Segment Forecasts, 2019 To 2025**. Disponível em: <<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/protein-hydrolysate-market>>. Acesso em: 26 de Abril de 2021.

HARNEDY, P.; FITZGERALD, R. J. Bioactive peptides from marine processing waste and shell fish: a review. **Journal of Functional Foods**, v. 4, p. 6-24, 2012.

HARTREE, E. F. Determination of protein: A modification of the Lowry methods that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v.48, p.422-427, 1972.

HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and their industrial applications. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 118, p. 155-170, 2004.

HUA G.; TSUKAMOTO, K.; TAGUCHI, R.; TOMITA, M.; MIYAJIMA, S.; IKEZAWA H. Characterization of aminopeptidase-N from the brush border membrane of the larvae midgut of silkworm, *Bombyx mori* as a zinc enzyme. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1383, p.301–10, 1998.

HUANG, H.; LOU X.; HU B.; ZHOU Z.; CHEN J., TIAN Y. A comprehensive study on the generation of reactive oxygen species in CuA β -catalyzed redox processes. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 135, p. 125–131, 2019.

JAMDAR, S. N.; HARIKUMAR, P. Autolytic degradation of chicken intestinal proteins. **Bioresource Technology**, v. 96, p.1276-1284, 2005.

KITTS, D. D.; WEILER, K. Bioactive Proteins and Peptides from Food Sources. Applications of Bioprocesses used in Isolation and Recovery. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, n. 16, p.1309-1323, 2003.

KLASING KIRK, C. Avian Gastrointestinal Anatomy and Physiology. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v.8, n. 2 (April), p. 42-45,1999.

KORHONEN, H., ANDA. PIHLANTO. Bioactive peptides: Production and functionality. **Int. Dairy J.** v. 16, p. 945–960, 2006.

LASEKAN, A.; BAKAR, F. A.; HASHIM, D. Potential of chicken by-products as sources of use full biological resources. **Waste Management**, v.33, n. 3, p.552-565, 2013.

LIU, Y., LIU, S., JIANG, G., DAI, Q. Optimization of exogenous carbohydrases supplemented in broiler diets using in vitro simulated gastrointestinal digestion and response surface methodology. **PLoS ONE** 16 (11), 2021.

LIU, Y. WAN, S.; LIU, J.; ZOU, Y.; LIAO, L. Antioxidant activity and stability study of peptides from enzymatically hydrolyzed male silkworm. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, p. e13081, 2017.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARRA. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal Biology Chemistry**, v. 193, p.265-275,1951.

MADHUSUDHAN, K. T.; COGAN, U.; MOKADY, S. Chicken pancreatic enzymes for clinical use: 2. Preparation and storage stability of lipase-rich pancreatin. **Journal of the Science Food and Agriculture**, v. 43, p. 59-66, 1988.

MAHAGNA, M.; NIR, I.; LARBIER, M.; NITSAN, Z. Effect of age and exogenous amylase and protease on development of the digestive tract, pancreatic enzyme activities and digestibility of nutrients in young meat-type chicks. **Reproduction Nutrition Development**, v.35, p. 201-212, 1995.

MAHDAVI-YEKTA M.; NOURI, L.; AZIZI, M. H.; The effects of hydrolysis condition on antioxidant activity of protein hydrolyzate from quinoa, **Food Sci. Nutr.** v. 7, p. 930– 936, 2019.

MANE, S.; DAMLE, M.; HARIKUMAR, P.; JAMDAR, S.; GADE, W. Purification and

characterization of aminopeptidase N from chicken intestine with potential application in debittering. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1011-1016, 2010.

MANE, S.; GADE, W.; SAHAYOG, J. Purification and characterization of proline aminopeptidase from chicken intestine. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1384-1389, 2011.

MARKETS & MARKETS. **Pea Protein Market by Type (Isolates, Concentrates, and Textured), Form (Dry and Wet), Source (Yellow split peas, Lentils, and Chickpeas), Application, and Region (North America, Europe, Asia Pacific, South America, and Rest of the World) - Global Forecast to 2025**. Disponível em: <<https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/pea-protein-market-36916504.html>>. Acesso em: 26 de Abril de 2021.

MATOS, F. M. Black cricket ("*Gryllus assimilis*") protein hydrolysates: effect of the combined enzymatic treatment of different proteases on obtaining peptides with antioxidant, antidiabetic and antihypertensive properties. **Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos)** – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2020.

MERIGÓ, J. M.; YANG, J. B. A bibliometric analysis of operations research and management science, **Omega**. v.73, p.37–48. 2017.

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

OLAGUNJU, A.I.; OMOBA, O. S.; ENUJIUGHA, V. N.; ALASHI, A. M.; ALUKO, R. E. Pigeon pea enzymatic protein hydrolysates and ultrafiltration peptide fractions as potential sources of antioxidant peptides: An in vitro study, **LWT**. v. 97, p. 269–278, 2018.

OSMAN, A. M.; ELKHATIM, M. M. Polysaccharides of the camel (*Camelus dromedarius*) intestine and pancreas. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v.69, n. 3, p. 429-436, 1981.

OSMAN, A. M. Amylase in chicken intestine and pancreas. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 73, n. 3, p.571-574, 1982.

PERIČIN, D.; RADULOVIC-POPOVIC, L.; VAŠTAG, Z.; MADAREV-POPOVIC, S.; TRIVIC, S. Enzymatic hydrolysis of protein isolate from hull-less pumpkin oil cake: application

of response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 115, p. 753-757, 2009.

PLIMMER, R. H. A.; ROSEDALE, L. J. Distribution of enzymes in the alimentary canal of the chicken. **Biochemical Journal**, v. 16, n. 1, p.23-26, 1922.

PUBOLS, M. H. Ratio of digestive enzymes in the chick pancreas. **Poultry Science**, v. 70, p.337-342, 1991.

RATHELOT, J.; JULIEN R.; CANIONI P.; COEROLIC.; SARDAL. Studies on the effect of bile salt and colipase on enzymatic lipolysis. Improved method for the determination of pancreatic lipase and colipase. **Biochimie**, v. 57, n.10, p. 1117-1122, 1976.

RATHINA RAJ, K.; MAHENDRAKAR, N. S.; Effect of ensiling and organic solvents treatment on proteolytic enzymes of layer chicken intestine. **Journal of Food Science Technology**, v. 47, n. 3, p.320-324, 2010a.

RATHINA RAJ, K.; SAKHARE, P. Z.; SACHINDRA, N. M.; MAHENDRAKAR, N. S.; Effect of ensilaging and organic solvent treatment on activity of proteases from chicken intestine. **Food Bioprocess Technology**, v. 3, p. 783-788, 2010b.

RAVINDRAN V. Feed enzymes: The science, practice, and metabolic realities. **Journal of Applied Poultry Research**. v.22, n. 3, p. 628–636, 2013.

RIZZELLO, C. G.; TAGLIAZUCCHI, D.; BADINI, E.; RUTELLA, G. S.; SAA, D. L.T.; GIANOTTI, A. Bioactive peptides from vegetable food matrices: Research trends and novel biotechnologies for synthesis and recovery. **Journal of Functional Foods**, v. 27, p. 549–569,2016.

RODRIGUES, M. I. & IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Campinas: Cárita editora, 2009.

ROMANELLI, J. P.; FUJIMOTO, J. T.; FERREIRA, M. D.; MILANEZ, D. H. Assessing ecological restoration as a research topic using bibliometric indicators, **Ecological Engineering**. v.120, p. 311–320, 2018.

SANTOS, J. G. Protease from *Bacillus licheniformis*: production, purification, characterization and application of the enzyme in the hydrolysis of rice and pea proteins. **Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos)** - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de

Campinas, Campinas, 2017.

SARANGI, B. K.; PATTANAIK, D. P.; RATHINA RAJ, K.; SACHINDRA, N. M.; MADHUSUDAN, M. C.; MAHENDRAKAR, N. S. Purification of alkaline protease from chicken intestine by aqueous two-phase system of polyethylene glycol and sodium citrate. **Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n.1, p. 36–44, 2010

SCHAGGER, H.; JOAGOW, V. Tricine-sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, v.166, p. 368-379, 1987.

SIDDONS, R. C. Carbohydrase activities in the bovine digestive tract. **Biochemical Journal**, v.108, n. 5, p. 839-844, 1968.

SOMOGYI, M. A. – A new reagent for the determination of sugars, **Journal of Biology and Chemistry**, v.160, p.61-68, 1945.

SRISANTISAENG, P.; GARNJANAGOONCHORN W.; THANACHASAI S.; CHOOTHESA, A. Proteolytic activity from chicken intestine and pancreas: extraction, partial characterization and application for hyaluronic acid separation from chicken comb. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 13, p. 3390-3394, 2013.

STEIN, H. H.; BOHLKE, R. A. The effect of thermal treatment of field peas (*Pisium sativum* L) on nutrient and energy digestibility by growing pigs. **Journal Animal Science**, v.85, p.1424-1431, 2007.

ŞTIRBU, S.; THIRION, P.; SCHMITZ, S.; HAESBROECK, G.; GRECO, N. The utility of google scholar when searching geographical literature: Comparison with three commercial bibliographic databases, **The Journal of Academic Librarianship**. v.41, p.322–329, 2015.

SUNDARRAM, A.; MURTHY, T. P. K. α -Amylase production and applications: A review. **Journal of Applied & Environmental Microbiology**, v.2, n. 4, p.166-175,2014.

SVIHUS, B. Starch digestion capacity of poultry. **Poultry Science**, v. 93, p. 2394-2399, 2014.

SVIHUS, B.; NEWMAN, R. K.; NEWMAN, C. W. Effect of soaking, germination, and enzyme treatment of whole barley on nutritional value and digestive tract parameters of broiler chickens. **British Poultry Science**, v. 38, p. 390-396, 1997.

THEODORE, A. E.; RAGHAVAN, S.; KRISTINSSON, H. G. Antioxidative activity of

protein hydrolysates prepared from alkaline-aided channel cat fish protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 56, p. 7459-7466, 2008.

TOLDRÁ, F., ARISTOY, M. C., MORA, L., & REIG, M. Innovations in value-addition of edible meat by-products. **Meat Science**, v. 92, p. 290-296, 2012.

USDA. Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. **Dados de mercado e comércio**. Washington, EUA. 2022. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/advQuery>>. Acesso em: 15 de Setembro de 2022.

VERGER, R.; HAAS, G. H.; SARDA, L.; DESNUELLE, P. Purification from porcine pancreas of two molecular species with lipase activity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 188, p. 272–282, 1969.

VISSANGUANAN, H. W.; Recovery of enzymes from sea food processing wastes. In: N. F. Haard & B.K. Simpson (Eds.). **Sea food enzymes**. New York: Marcel Dekker, 2000. p.641-664.

WATANABE, N., OTA, Y., MINODA, Y. & YAMADA, K. Isolation and identification of alkaline lipase producing microorganisms, cultural conditions and some properties of crude enzymes. **Agricultural and Biological Chemistry** v. 41, p.1353–1358, 1977.

WELKER, S. J.; ROSA, P. A.; MOURA, J. D.; MACHADO, P. L.; CATELAN, F.; UTPATEL, R. Temperatura corporal de frangos de corte em diferentes sistemas de climatização. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 8, p.1.463-1.467, 2008.

WILLAMIL, J.; BADIOLA, I.; DEVILLARD, E.; GERAERT, P. A.; TORRALLARDONA, D. Wheat-barley-rye or corn-fed growing pigs respond differently to dietary supplementation with a carbohydrase complex. **Journal of Animal Science**, v.90, p. 824-832, 2012.

WIRIYAPHAN, C.; CHITSOMBOON, B.; YONGSAWADIGUL, J. Antioxidant activity of protein hydrolysates derived from threadfin bream surimi byproducts. **Food Chemistry**, v. 132, n. 1, p. 104-111, 2012.

WOLLINGER, A. *et al.* Antioxidant activity of hydro distillation water residues from *Rosmarinus officinalis* L. leaves determined by DPPH assays. **Comptes Rendus Chimie**, v. 19, p. 754–765, 2016.

ZHANG, G., AO, Z., HAMAKER, B.R. Slow digestion property of native cereal starches. **Biomacromolecules**. v. 7, n. 11, 3252, 2006.

ZHAO, F.; HOU, S. S.; ZHANG, H. F.; ZHANG, Z. Y. Effects of dietary metabolizable energy and crude protein content on the activities of digestive enzymes in jejunal fluid of Peking ducks. **Poultry Science**, v. 86, n. 8, p. 1690-1695, 2007.