



Hidrolisados proteicos de grilo-preto (*Gryllus assimilis*) como fonte de peptídeos moduladores do crescimento microbiano

Stephan Shih*, Francielle Miranda de Matos, Ruann Janser Soares de Castro

Laboratório de Bioquímica de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp.

Introdução

Os insetos são considerados altamente nutritivos, sendo excelentes fontes de proteínas, ácidos graxos e micronutrientes. Além disso, os insetos são produzidos em sistemas mais sustentáveis quando comparados aos principais sistemas de criação e cultivo, em especial aqueles destinados à produção de animais de grande porte. Mundialmente, mais de 1900 espécies de insetos já foram catalogadas como comestíveis (FAO, 2013).

Além de serem excelentes alimentos, o alto teor proteico dos insetos faz com que eles se tornem fontes potenciais para a obtenção de peptídeos bioativos. Estes são definidos como fragmentos proteicos com sequência de aminoácidos específica que apresentam atividades biológicas diversas, podendo atuar como anti-hipertensivos, antimicrobianos, antidiabéticos e antioxidantes (de Castro & Sato, 2015). A obtenção desses peptídeos é feita principalmente a partir da fermentação microbiana ou da hidrólise enzimática.

Peptídeos com atividade antimicrobiana estão amplamente distribuídos na natureza e são elementos essenciais do sistema imune dos organismos contra micro-organismos exógenos. Esses peptídeos possuem características como baixa toxicidade e alta especificidade na ação (de Castro & Sato, 2015).

Diante dessa possibilidade e buscando agregar diferentes valores biológicos às proteínas dos insetos, o nosso estudo avaliou a capacidade antimicrobiana de hidrolisados de proteínas de grilo-preto.

Material e Métodos

A farinha de grilo-preto (*Gryllus assimilis*) utilizada neste projeto foi produzida a partir dos insetos desidratados, gentilmente doados pela empresa Agrin – Criação e Comércio de Insetos (Avaré, São Paulo, Brasil).



Figura 1. Esquema simplificado das etapas envolvidas no projeto.

As proteínas da farinha de grilo-preto foram extraídas, concentradas (Zielińska, Karaś, & Baraniak, 2018) e utilizadas como substrato para as hidrólises enzimáticas. Três proteases comerciais foram utilizadas neste estudo: Flavourzyme® 500L de *Aspergillus oryzae*, Alcalase® 2.4L de *Bacillus licheniformis* e Neutrase® 0.8L de *Bacillus amyloliquefaciens* (Sigma Aldrich).

O processo de hidrólise enzimática utilizando o planejamento experimental de misturas englobou dez ensaios com os componentes avaliados em 6 níveis: 1) 0 (0%), 2) 1/6 (16,67%), 1/3 (33%), 1/2 (50%), 2/3 (66,67%) e 1 (100%) como mostrado na Tabela 1. As hidrólises foram conduzidas utilizando soluções de proteínas de grilo-preto (100 mg/mL) em tampão fosfato pH 7, durante 2 h a 50°C e concentração enzimática ajustada para 100 U/mL. Os hidrolisados foram congelados e liofilizados para as avaliações de atividade microbiana.

Todos os experimentos realizados foram analisados comparativamente com as suas respectivas amostras não hidrolisadas.

Tabela 1. Matriz do planejamento experimental de misturas para obtenção de peptídeos antimicrobianos por meio da hidrólise enzimática de proteína concentrada de grilos utilizando diferentes preparações de proteases.

Ensaio	Proteases		
	Flavourzyme® 500L	Alcalase® 2.4L	Neutrase® 0.8L
Controle	-	-	-
1	1	0	0
2	0	1	0
3	0	0	1
4	1/2	1/2	0
5	1/2	0	1/2
6	0	1/2	1/2
7	2/3	1/6	1/6
8	1/6	2/3	1/6
9	1/6	1/6	2/3
10	1/3	1/3	1/3

A avaliação da atividade antimicrobiana dos hidrolisados de concentrado proteico de grilo-preto foi realizada utilizando três culturas bacterianas: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 11229 e *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium ATCC 14028. As culturas bacterianas foram reativadas em caldo nutriente, incubadas para crescimento a 37°C e diluídas em meio de cultura para obtenção da densidade ótica (DO) adequada para a realização dos testes de atividade antimicrobiana.

O crescimento microbiano foi monitorado utilizando o leitor de microplacas Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific, Finlândia) a 600 nm e microplacas de 96 poços, segundo método descrito por de Castro & Sato (2016). O resultado foi expresso em termos percentuais, sendo calculado como a razão da DO₆₀₀ dos meios contendo as amostras de hidrolisados proteicos e a DO₆₀₀ do ensaio controle.

O software Statistica®13 da TIBCO Software Inc. (Palo Alto, California, EUA) foi utilizado para análise dos resultados do planejamento experimental e definição dos modelos estatísticos. Os resultados também foram analisados estatisticamente pela Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey, realizado com auxílio do software Minitab® 19 de Minitab Inc. (Pensilvânia, EUA). Os valores foram expressos como média aritmética e considerados estatisticamente diferentes quando os valores de *p* foram inferiores a 0,05.

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos para atividade antimicrobiana dos hidrolisados proteicos de proteína de grilo-preto sobre os micro-organismos *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 11229 e *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, após 6 e 12 h de cultivo, estão representados, respectivamente, nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Atividade antimicrobiana dos hidrolisados proteicos de grilo-preto frente aos micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella Typhimurium* após 6 h de cultivo.

Ensaio	Inibição (%)		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella Typhimurium</i>
1	-43,48 ± 15,14	-4,64 ± 0,49	-10,62 ± 5,25
2	-25,89 ± 10,03	-6,64 ± 0,84	9,74 ± 2,33
3	-32,25 ± 8,12	-26,39 ± 1,22	-12,28 ± 3,06
4	-73,20 ± 9,87	-28,24 ± 2,30	-10,33 ± 1,47
5	-96,43 ± 11,94	-29,53 ± 1,87	-10,51 ± 1,37
6	-11,58 ± 7,40	-13,31 ± 1,44	-8,15 ± 2,41
7	15,48 ± 0,28	-32,39 ± 2,82	-16,91 ± 1,27
8	-44,62 ± 0,43	-25,31 ± 2,84	-12,02 ± 1,24
9	-23,64 ± 1,95	-29,86 ± 3,98	-16,24 ± 2,27
10	10,79 ± 4,86	-31,22 ± 3,30	-23,01 ± 1,24

Tabela 3. Atividade antimicrobiana dos hidrolisados proteicos de grilo-preto frente aos micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella Typhimurium* após 12 h de cultivo.

Ensaio	Inibição (%)		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella Typhimurium</i>
1	21,55 ± 1,26	-1,50 ± 0,19	39,00 ± 4,28
2	31,69 ± 11,27	6,37 ± 0,93	52,76 ± 4,87
3	50,40 ± 4,49	2,64 ± 0,37	26,13 ± 2,96
4	13,10 ± 2,83	1,42 ± 0,16	26,71 ± 1,74
5	24,43 ± 7,27	-3,48 ± 0,43	15,92 ± 1,76
6	21,02 ± 2,90	-4,12 ± 0,80	14,20 ± 4,41
7	74,16 ± 0,68	-5,15 ± 0,55	15,26 ± 2,20
8	-22,69 ± 5,59	-4,15 ± 0,27	9,24 ± 1,78
9	62,90 ± 3,77	-17,46 ± 2,15	4,09 ± 2,24
10	72,76 ± 0,75	-20,14 ± 1,51	7,62 ± 1,48

De maneira geral, os hidrolisados proteicos de grilo-preto nas condições de ensaio descritas neste estudo, apresentaram resultados variados quanto à capacidade de inibição dos micro-organismos. Após 6 h de cultivo (Tabela 2), a grande maioria dos hidrolisados promoveu um estímulo ao crescimento das bactérias patogênicas, quando comparados aos respectivos ensaios controle. O maior estímulo no crescimento foi observado no ensaio 5, contendo proteína hidrolisada por Flavourzyme® 500L (1/2) e Neutrase® 0.8L (1/2), com a linhagem de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, atingindo um crescimento 96,43% maior que o respectivo controle.

Por outro lado, após 12 h de cultivo (Tabela 3), a maior parte dos ensaios apresentou inibição em relação ao controle. A maior inibição no crescimento foi observada no ensaio 7, contendo proteína hidrolisada por Flavourzyme® 500L (1/3), Alcalase® 2.4L (1/3) e Neutrase® 0.8L (1/3), com a linhagem de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, no qual observou-se crescimento 74,16% menor que o respectivo ensaio controle.

A partir dos dados obtidos para atividade antimicrobiana dos hidrolisados proteicos de grilo-preto, foi possível gerar modelos para as respostas obtidas durante o cultivo de *Salmonella Typhimurium* após 6 e 12 h e para a *Escherichia coli* após 6 h.

Os modelos gerados, valores de R², de F e p-valor para cada resposta são apresentados na Tabela 4. Os valores de R² obtidos na análise de variância (ANOVA) foram altos, variando de 0,91 a 0,99, indicando que os modelos foram capazes de explicar de 91 a 99% das variações dos resultados em função das enzimas e suas combinações aplicadas em cada ensaio.

Tabela 4. Análise de variância (ANOVA) para verificação da adequação estatística dos modelos codificados aos pontos reais para as diferentes respostas de crescimento de bactérias patogênicas em meios suplementados com proteínas hidrolisadas.

Atividade antimicrobiana sobre <i>Salmonella Typhimurium</i> (6 h)						
Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média dos quadrados	Fcalculado/Ftabelado	R ²	valor-p
Regressão	645,33	5	128,47	84,04/4,05	0,99	< 0,001
Residual	6,11	4	1,53			
Total	648,44					
<i>Modelo Especial Cúbico: -9,95x₁ + 9,22x₂ - 11,48x₃ - 40,93x₁x₂ - 28,64x₂x₃ - 293,08x₁x₂x₃</i>						
Atividade antimicrobiana sobre <i>Salmonella Typhimurium</i> (12 h)						
Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média dos quadrados	Fcalculado/Ftabelado	R ²	valor-p
Regressão	1920,57	5	384,11	8,57/4,05	0,91	0,029
Residual	179,33	4	44,83			
Total	2099,90					
<i>Modelo Quadrático: 40,01x₁ + 51,04x₂ + 26,41x₃ - 94,61x₁x₂ - 80,52x₁x₃ - 120,39x₂x₃</i>						
Atividade antimicrobiana sobre <i>Escherichia coli</i> (6 h)						
Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média dos quadrados	Fcalculado/Ftabelado	R ²	valor-p
Regressão	932,30	4	233,08	21,13/3,52	0,94	0,002
Residual	55,16	5	11,03			
Total	987,46					
<i>Modelo Quadrático: -5,31x₁ - 6,35x₂ - 25,42x₃ - 102,86x₁x₂ - 67,18x₁x₃</i>						

As curvas de contorno geradas auxiliam na interpretação dos dados e na verificação dos efeitos das enzimas e de suas interações sobre a atividade antimicrobiana.

Para a *Salmonella Typhimurium* após 6 h de incubação (Figura 2-A), podemos verificar que o uso isolado da enzima Alcalase® 2.4L resultou em um hidrolisado proteico com a maior capacidade antimicrobiana. O mesmo comportamento é observado para a curva de contorno gerada após 12 h de incubação, além do aparecimento da inibição provocada pelo uso isolado da enzima Flavourzyme® 500L (Figura 2-B).

No caso da linhagem de *Escherichia coli* após 6 h de incubação, verificamos a partir da sua curva de contorno (Figura 2-C) que o hidrolisado que promoveu o menor estímulo no crescimento das linhagens de bactérias foi obtido a partir do uso isolado da Flavourzyme® 500L, seguido do uso isolado da Alcalase® 2.4L e da combinação binária da Alcalase® 2.4L (1/2) com a Neutrase® 0.8L (1/2).

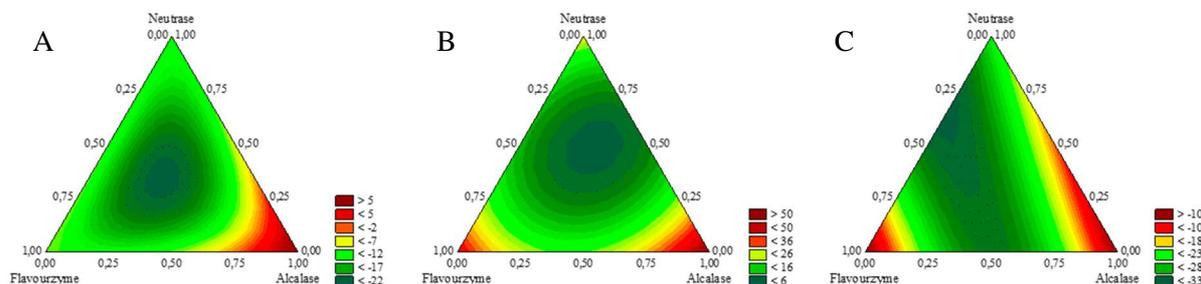


Figura 2. Curvas de contorno geradas para o crescimento de *Salmonella Typhimurium* ATCC 1402 após 6 h (A), *Salmonella Typhimurium* ATCC 1402 após 12 h (B) e *Escherichia coli* ATCC 11229 após 6 h (C) na presença de proteína hidrolisada de grilo preto com Flavourzyme® 500L, Alcalase® 2.4L e Neutrase® 0.8L.

As propriedades antimicrobianas de peptídeos obtidos a partir da hidrólise de insetos ainda não foi relatada na literatura. No entanto, a atividade antimicrobiana de hidrolisados proteicos está intimamente ligada à capacidade dos peptídeos interagirem com componentes da parede e da membrana celular, promovendo alterações de permeabilidade, tornando os micro-organismos mais susceptíveis à inibição e até mesmo à morte.

Conclusão

Este trabalho permitiu um maior entendimento sobre a capacidade antimicrobiana de hidrolisados proteicos produzidos a partir da hidrólise enzimática da proteína de grilo-preto (*Gryllus assimilis*). Os resultados obtidos para a capacidade antimicrobiana dos peptídeos contra as linhagens de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 11229 e *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 mostraram resultados variados na inibição do crescimento.

Referências Bibliográficas

- DE 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.
- DE CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Simultaneous hydrolysis of proteins from different sources to enhance their antibacterial properties through the synergistic action of bioactive peptides. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 8, p. 209-212, 2016.
- FAO. **Edible insects: Future prospects for food and feed security**. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013.
- ZIELIŃSKA, E.; KARAŚ, M.; BARANIAK, B. Comparison of functional properties of edible insects and protein preparations thereof. **LWT - Food Science and Technology**, v. 91, p. 168-174, 2018.

Agradecimentos

Ao Programa de Iniciação Científica da UNICAMP (PIBIC), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos e ao Laboratório de Bioquímica de Alimentos da FEA pela oportunidade de realização do projeto e aprimoramento dos conhecimentos científicos.