



IMPACTO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS DA LARVA DA MOSCA SOLDADO-NEGRA (*Hermetia illucens*) UTILIZANDO COMBINAÇÕES DE PROTEASES SOBRE SUAS PROPRIEDADES BIOATIVAS

Palavras-Chave: proteínas de inseto, hidrólise enzimática, peptídeos bioativos

Autores(as): Leonardo Buzaneli Cristianini, FEA – UNICAMP, Yuri Matheus Silva Amaral, FEA – UNICAMP
Prof. Dr. Ruann Janser Soares de Castro (orientador), FEA – UNICAMP

INTRODUÇÃO

A busca por alimentos sustentáveis é uma das metas estabelecidas pela ONU até 2030, visando reduzir o consumo de recursos naturais e mitigar a poluição ambiental (BERNERSLEE et al., 2018). A entomofagia, prática de consumir insetos como fonte de alimento, é uma solução promissora para suprir a demanda alimentar da crescente população mundial. Insetos possuem alto valor nutricional e baixo impacto ambiental, sendo amplamente consumidos em diversos países (BATISH et al., 2020).

As larvas da mosca soldado-negra (*Hermetia illucens*) são bastante exploradas na decomposição de matéria orgânica, e pelo alto conteúdo de proteínas (~40%) e de lipídeos (~30%), também têm sido utilizadas como ingredientes na alimentação de peixes. Apesar das vantagens, a entomofagia enfrenta resistência devido a preconceitos culturais. No entanto, transformar insetos em concentrados e hidrolisados proteicos pode ser uma estratégia interessante para incorporá-los na produção de alimentos, pois, além de descaracterizar o material de origem, promove a melhoria de propriedades funcionais e biológicas (GRAVEL; DOYEN, 2020).

METODOLOGIA

A farinha desengordurada de larvas da mosca soldado-negra contendo de 70 a 75% de proteínas foi fornecida pela empresa Agrin Criação e Comércio de Insetos, localizada em Avaré (São Paulo). As preparações de proteases comerciais (Alcalase, Flavourzyme e Neutrase) foram utilizadas para a produção de hidrolisados proteicos utilizando o planejamento experimental (Tabela 1). A hidrólise enzimática foi realizada utilizando suspensões da farinha (100 mg/mL) preparadas em tampão fosfato (pH 7) adicionadas de 100 U/mL das proteases, que foram posteriormente incubadas a 50°C sob agitação de 100 rpm durante 120 minutos. A atividade proteolítica das enzimas foi realizada conforme descrito por De Castro e Sato (2015).

As propriedades antioxidantes foram determinadas por meio dos métodos ABTS e DPPH, descritos por Rasera et al. (2019) e FRAP descrito por Matos, Novelli e De Castro (2021). O teor de proteína solúvel em TCA foi utilizado como medida indireta do grau de hidrólise proteica de acordo com o método descrito por De Castro e Sato (2015). A atividade antidiabética foi quantificada por meio da inibição das enzimas α -amilase e α -glicosidase, e a atividade anti-hipertensiva, mensurada por meio da inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) de acordo com o método descrito por Matos et al. (2022). Definidas as condições mais adequadas de hidrólise, uma cinética de 180 minutos foi realizada e em seguida a proteína hidrolisada foi fracionada por

ultrafiltração utilizando membranas com corte de 30, 10, 5 e 3 kDa; essa última etapa foi realizada somente para atividade antioxidante.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Peptídeos bioativos podem ser liberados da proteína nativa pela ação de proteases. Diversas proteases são largamente comercializadas e aplicadas industrialmente, como a Alcalase, a Flavourzyme e a Neutrase, as quais apresentam certas sobreposições em suas condições ótimas de atuação (pH 5,0 a 8,0 e temperaturas de 50 a 60°C), mas com mecanismos de atuação que diferem em endo e exoproteases (AGUILAR, GRANATO CAZON, DE CASTRO, 2019). Os resultados para a atividade antioxidante, pelos métodos de ABTS, DPPH e FRAP, proteína solúvel em TCA e inibição das enzimas α -amilase, α -glicosidase e ECA estão dispostos na Tabela 1.

A combinação ternária entre Flavourzyme (2/3), Alcalase (1/6) e Neutrase (1/6) (ensaio 7), resultou em hidrolisados com os maiores valores de atividade antioxidante quantificadas pelos métodos ABTS (588,04 μ mol TE/g) e FRAP (76,92 μ mol TE/g); valores estes que foram 48% e 14%, respectivamente, superiores à amostra controle (C) (não hidrolisada). Para o método DPPH, o maior valor observado foi 35,72 μ mol TE/g, quando Flavourzyme e Neutrase em iguais proporções foram utilizadas na hidrólise (ensaio 5). Lone et al., (2023) observaram resultados semelhantes após a realização da hidrólise enzimática de proteínas de grilo (*Acheta domestica*) utilizando Alcalase, com aumento de 35% na atividade antioxidante (ABTS) em relação à proteína não hidrolisada.

A atividade antioxidante promovida pelos peptídeos bioativos consiste na doação de elétrons e átomos de H por resíduos aromáticos, hidrofóbicos, cadeias laterais carregadas e aminoácidos com sulfidrilas (NWACHUKWU, ALUKU, 2018).

De acordo com Zou et al., (2016), peptídeos menores costumam apresentar maior atividade antioxidante, todavia a composição aminoacídica tem forte influência sobre esta capacidade. Os resultados apresentados na Tabela 1 demonstraram que diversos ensaios apresentaram teor de proteína solúvel em TCA superior a 60%, um indicativo do alto grau de hidrólise.

Para inibição da enzima α -amilase (Tabela 1) foi verificado que os hidrolisados produzidos após aplicação da combinação binária entre Flavourzyme (1/2) e Alcalase (1/2) (ensaio 4) resultaram em aproximadamente 45% de inibição, seguidos dos hidrolisados produzidos no ensaio 2 (40% de inibição) e ensaio 7 (34% de inibição). No caso da α -glicosidase, a combinação ternária de Flavourzyme (1/6), Alcalase (1/6) e Neutrase (2/3) resultou em hidrolisados capazes de inibir cerca 12% a atividade desta enzima. Resultados semelhantes foram observados por Matos et al. (2022), onde hidrolisados de grilo preto (*Gryllus assimilis*) obtidos com uma combinação de Flavourzyme (1/2) e Alcalase (1/2) inibiram em torno de 47% a atividade de α -amilase e 13% a de α -glicosidase. De acordo com os autores, os mecanismos de inibição embora ainda não elucidados, parecem estar relacionados com interações irreversíveis entre a enzima e os peptídeos.

Os hidrolisados proteicos apresentaram excelente potencial anti-hipertensivo, mensurado pela capacidade de inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA), com inibições acima de 60% em quase todos os ensaios. O destaque foi para o ensaio 6, referente à combinação binária de Alcalase (1/2) e Neutrase (1/2), que resultou em hidrolisados capazes de inibir em aproximadamente 76% a atividade da ECA (Tabela 1).

Yoon et al. (2019) estudaram a hidrólise de um concentrado proteico de larva de bicho-da-seda utilizando Flavourzyme e Alcalase e verificaram que os hidrolisados foram capazes de inibir em aproximadamente 45 e 70% a atividade da ECA, respectivamente; resultados estes semelhantes aos obtidos em nosso estudo (Tabela 1). A inibição da ECA provavelmente se dá de forma não competitiva, em função da interação dos peptídeos com o sítio ativo da enzima (Matos et al., 2022).

Tabela 1 – Matriz do planejamento experimental de misturas utilizado para estudar os efeitos de diferentes proteases e suas combinações sobre a obtenção de hidrolisados proteicos de larvas da mosca soldado-negro e resultados obtidos para atividade antioxidante mensurada pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP, conteúdo de proteína solúvel em TCA, inibição de α -amilase, α -glicosidase e ECA.

Ensaio	Proteases			ABTS ($\mu\text{mol TE/g}$) ⁵	Variação (%)	DPPH ($\mu\text{mol TE/g}$)	Variação (%)	FRAP ($\mu\text{mol TE/g}$)	Variação (%)	Proteína solúvel em TCA (%)	Inibição (%)		
	F ²	A ³	N ⁴								α -amilase	α -glicosidase	ECA
C ¹	0	0	0	396,75 \pm 9,99 ^f	-	27,11 \pm 0,85 ^e	-	66,68 \pm 2,07 ^{bcd}	-	43,51 ^d	4,90 \pm 0,64 ^h	11,39 \pm 2,89 ^g	-47,33 \pm 1,10 ^d
1	1	0	0	357,95 \pm 12,09 ^g	-9,78	24,14 \pm 0,87 ^f	-10,96	70,83 \pm 0,63 ^{ab}	6,22	60,27 ^{bc}	-34,08 \pm 0,22 ^c	9,84 \pm 1,62 ^{fg}	-46,02 \pm 1,94 ^d
2	0	1	0	385,27 \pm 7,04 ^f	-2,89	24,64 \pm 1,52 ^f	-9,11	61,37 \pm 1,35 ^{de}	-7,96	51,74 ^{cd}	-40,71 \pm 1,06 ^b	3,10 \pm 3,44 ^{de}	-62,27 \pm 1,52 ^{bc}
3	0	0	1	427,43 \pm 9,94 ^e	7,73	30,08 \pm 0,61 ^{bc}	10,96	68,98 \pm 2,08 ^{bc}	3,45	60,02 ^{bc}	-14,56 \pm 1,07 ^g	4,74 \pm 1,62 ^{ef}	-70,23 \pm 5,34 ^{ab}
4	1/2	1/2	0	533,71 \pm 8,16 ^b	34,52	27,25 \pm 0,56 ^{de}	0,52	62,01 \pm 1,72 ^{de}	-7,00	61,59 ^b	-44,83 \pm 1,65 ^a	4,87 \pm 0,56 ^{ef}	-52,15 \pm 4,62 ^{cd}
5	1/2	0	1/2	500,7 \pm 5,46 ^e	26,20	35,72 \pm 0,27 ^a	31,76	70,03 \pm 0,14 ^b	5,02	74,50 ^a	-23,75 \pm 1,66 ^e	-4,14 \pm 1,05 ^{bc}	-61,58 \pm 2,37 ^{bc}
6	0	1/2	1/2	423,05 \pm 8,08 ^e	6,63	29,56 \pm 0,37 ^{bcd}	9,04	56,11 \pm 2,28 ^{ef}	-15,85	59,52 ^{bc}	-26,50 \pm 0,83 ^e	-4,10 \pm 1,04 ^{bc}	-75,63 \pm 3,89 ^a
7	2/3	1/6	1/6	588,04 \pm 7,73 ^a	48,21	30,15 \pm 0,88 ^{bc}	11,21	76,29 \pm 3,23 ^a	14,41	61,98 ^b	-34,40 \pm 0,43 ^c	-1,25 \pm 1,42 ^{cd}	-62,14 \pm 1,16 ^{bc}
8	1/6	2/3	1/6	422,99 \pm 6,21 ^e	6,61	28,47 \pm 1,14 ^{cde}	5,02	63,63 \pm 0,36 ^{cd}	-4,57	64,27 ^b	-24,28 \pm 0,18 ^e	-6,25 \pm 0,37 ^{abc}	-64,05 \pm 3,81 ^b
9	1/6	1/6	2/3	453,19 \pm 1,58 ^d	14,23	31,78 \pm 0,54 ^b	17,23	53,94 \pm 4,25 ^f	-19,11	65,02 ^b	-18,25 \pm 0,81 ^f	-11,56 \pm 1,75 ^a	-61,29 \pm 6,46 ^{bc}
10	1/3	1/3	1/3	481,28 \pm 8,56 ^c	21,31	29,89 \pm 0,23 ^{bc}	10,25	55,06 \pm 1,22 ^f	-17,43	60,14 ^{bc}	-29,97 \pm 0,32 ^d	-7,04 \pm 1,87 ^{ab}	64,04 \pm 5,63 ^b

¹C refere-se à amostra controle (não hidrolisada). ²F refere-se à Flavourzyme. ³A refere-se à Alcalase. ⁴N refere-se à protease Neutrase. ⁵A unidade $\mu\text{mol TE/g}$ corresponde a μmol de Trolox Equivalentes por grama de proteína. Os resultados são apresentados como a média ($n = 3$) \pm DP e, quando seguidos por letras diferentes na mesma coluna, indicam a diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey. *A variação na atividade antioxidante foi calculada considerando os valores obtidos para os hidrolisados de proteína (ensaio de 1 a 10) em relação ao ensaio controle (proteína não hidrolisada).

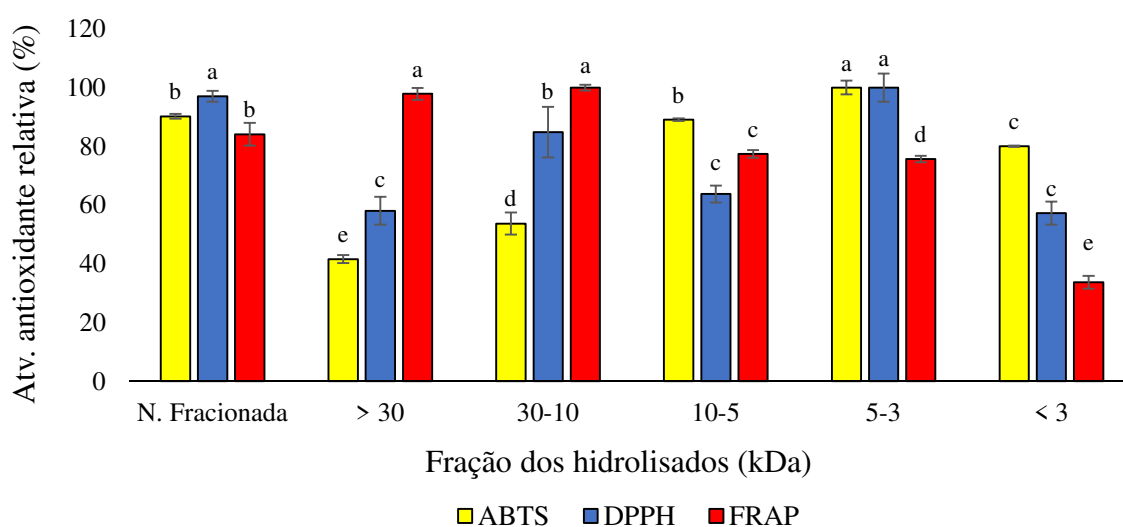
A condição do ensaio 7 foi selecionada para o estudo da cinética de hidrólise, visto que resultou em amostras com destacado potencial antioxidante. Os resultados para a atividade antioxidante (ABTS, DPPH e FRAP) ao longo do tempo, além da atividade residual das proteases estão dispostos na Tabela 2. De modo geral, o ensaio de 120 minutos foi o que apresentou os maiores valores de atividade antioxidante, como segue: ABTS (783,33 $\mu\text{mol TE/g}$), DPPH (67,68 $\mu\text{mol TE/g}$) e FRAP (92,44 $\mu\text{mol TE/g}$). Tempos menores de hidrólise provavelmente resultaram em menor grau de hidrólise das proteínas, reduzindo a concentração de peptídeos e a atividade antioxidante, enquanto tempos maiores acarretaram hidrólises mais extensivas, reduzindo o tamanho dos peptídeos de tal forma que as propriedades antioxidantes foram reduzidas. Em relação à atividade residual das proteases ao longo dos 180 minutos de reação, apenas 25% da atividade enzimática foi perdida, demonstrando a boa estabilidade das preparações enzimáticas sob as condições de hidrólise. Aguilar et al., (2019) sugere que a mistura de enzimas resulta em maior resistência térmica pela formação de um complexo enzimático.

Tabela 2 – Cinética de hidrólise das proteínas da larva da mosca soldado-negra e resultados obtidos para atividade antioxidante mensurada pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP e a atividade residual das proteases.

Ensaio	ABTS ($\mu\text{mol TE/g}$)	Variação (%)	DPPH ($\mu\text{mol TE/g}$)	Variação (%)	FRAP ($\mu\text{mol TE/g}$)	Variação (%)	Atividade residual de proteases (%)
C ¹	655,19 \pm 4,69 ^d	-	30,02 \pm 1,63 ^c	-	73,72 \pm 4,16 ^{bc}	-	-
30 min	776,52 \pm 5,73 ^{ab}	18,52	65,13 \pm 1,41 ^a	116,95	81,14 \pm 3,51 ^b	10,07	100,00 \pm 5,39 ^a
60 min	766,30 \pm 10,69 ^{abc}	16,69	63,44 \pm 7,73 ^a	111,32	80,32 \pm 1,55 ^b	8,96	92,17 \pm 5,36 ^{ab}
90 min	728,59 \pm 6,32 ^c	11,20	61,92 \pm 1,45 ^a	106,27	67,14 \pm 0,59 ^c	-8,92	83,65 \pm 3,81 ^{bc}
120 min	783,33 \pm 13,78 ^a	19,56	67,68 \pm 1,00 ^a	125,46	92,44 \pm 4,26 ^a	25,40	80,46 \pm 1,78 ^c
150 min	755,19 \pm 32,45 ^{abc}	15,26	63,98 \pm 0,69 ^a	113,12	67,10 \pm 5,23 ^c	-8,98	80,23 \pm 1,05 ^c
180 min	734,81 \pm 6,86 ^{bc}	12,15	68,37 \pm 0,09 ^a	127,77	81,61 \pm 1,34 ^b	10,70	75,25 \pm 5,82 ^c

¹C refere-se à amostra controle (não hidrolisada). Os resultados são apresentados como a média (n = 3) \pm DP e, quando seguidos por letras diferentes na mesma coluna, indicam a diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey. *A variação na atividade antioxidante foi calculada considerando os valores obtidos para os hidrolisados de proteína obtidos ao longo do tempo em relação ao ensaio controle (proteína não hidrolisada).

Com relação ao fracionamento por ultrafiltração, a fração de peptídeos com massa molecular entre 5 e 3 kDa apresentou os maiores valores de atividade antioxidante nos métodos ABTS e DPPH enquanto para o FRAP, o maior resultado foi obtido pelas frações de massas moleculares maiores que 30 kDa e entre 30 -10 kDa (Figura 1). Peptídeos de baixa massa molecular são mais solúveis, de modo a contribuir positivamente com a capacidade antioxidante. De forma contrária, os peptídeos de maior massa molecular, apresentaram resultados maiores para o método FRAP. Um comportamento semelhante foi encontrado por Sarkar et al. (2023) durante suas análises com hidrolisado proteico de pupas do bicho-da-seda (*Antheraea assama*), onde as frações com massas moleculares maiores que 10 kDa obtiveram valores maiores que as frações >3 kDa no método DPPH, enquanto para o método ABTS, o comportamento foi o inverso, sendo detectada, portanto, maior atividade antioxidante nas frações menores.



*Letras diferentes entre as colunas (frações de massa molecular) de um mesmo método de quantificação da atividade antioxidante significam diferença estatística (p < 0,05) pelo teste de Tukey.

Figura 1. Atividade antioxidante relativa de frações de hidrolisados proteicos de larvas da mosca soldado-negra obtidas por ultrafiltração.

CONCLUSÕES:

As proteínas de larvas da mosca soldado-negro hidrolisadas enzimaticamente com diferentes proteases comerciais mostraram-se um bom substrato para produção de peptídeos com potencial bioativo. A aplicação da mistura ternária das proteases Flavourzyme (2/3), Alcalase (1/6) e Neutrase (1/6) (ensaio 7) foi considerada a condição mais adequada para o tratamento enzimático e resultou em peptídeos com atividade antioxidante até 48% superior quando comparada à amostra não hidrolisada, além de atividade anti-hipertensiva (inibição de ~62% da atividade da ECA) e antidiabética (inibição de ~34% para a α -amilase). O estudo cinético mostrou que o tempo de hidrólise de 120 minutos foi o mais adequado para obtenção de peptídeos bioativos, onde frações com 5 a 3 kDa foram responsáveis por uma maior contribuição para a atividade antioxidante.

BIBLIOGRAFIA

- AGUILAR, J. G. dos S.; GRANATO CASON, V.; DE CASTRO, R. J. S. Improving antioxidant activity of black bean protein by hydrolysis with protease combinations. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 54, n. 1, p. 34-41, 2019.
- BATISH, I. et al. Effects of enzymatic hydrolysis on the functional properties, antioxidant activity and protein structure of black soldier fly (*Hermetia illucens*) protein. **Insects**, v. 11, n. 12, p. 1–12, 2020.
- BERNERS-LEE, M. et al. Current global food production is sufficient to meet human nutritional needs in 2050 provided there is radical societal adaptation. **Elementa**, v. 6, 2018.
- DE CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Synergistic actions of proteolytic enzymes for production of soy protein hydrolysates with antioxidant activities: An approach based on enzymes specificities. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 694–702, 2015.
- DE MATOS, F. M.; NOVELLI, P. K.; DE CASTRO, R. J. S. Enzymatic hydrolysis of black cricket (*Gryllus assimilis*) proteins positively affects their antioxidant properties. **Journal of Food Science**, v. 86, n. 2, p. 571–578, 2021.
- DE MATOS, F. M. et al. Production of black cricket protein hydrolysates with α -amylase, α -glucosidase and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities using a mixture of proteases. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 39, January 2022, p. 102276, 2022.
- GRAVEL, A.; DOYEN, A. The use of edible insect proteins in food: Challenges and issues related to their functional properties. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 59, n. December 2019, p. 102272, 2020.
- LONE, A. B. et al. Cricket protein hydrolysates pre-processed with ultrasonication and microwave improved storage stability of goat meat emulsion. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 86, June 2023, p. 103364, 2023.
- NWACHUKWU, I. D.; ALUKO R. E. Structural and functional properties of food protein-derived antioxidant peptides. **Journal of Food Biochemistry**, v. 43, n. 1, p. 1-13, 2018.
- RASERA, G. B., et al. Biologically active compounds from white and black mustard grains: an optimization study for recovery and identification of phenolic antioxidants. **Industrial Crops and Products**, v. 135, September 2019, p. 294-300, 2019.
- SARKAR, P. et al. Evaluation of Anti-Oxidant and ACE-Inhibitory Properties of Protein Hydrolysates Obtained from Edible Non-Mulberry Silkworm Pupae (*Antheraea assama* and *Philosomia ricinii*). **Nutrients**, v.15, n.4, p. 1035, 2023.
- SOUSA, P. BORGES S.; PINTADO, R. Enzymatic hydrolysis of insect *Alphitobius diaperinus* towards the development of bioactive peptide hydrolysates. **Food & Function**, v. 11, n. 4, p. 3539-3548, 2020.
- YOON, S. et al. Comparative Characterization of Protein Hydrolysates from Three Edible Insects: Mealworm Larvae, Adult Crickets, and Silkworm Pupae. **Foods**, v. 8, n. 11, p. 563, 2019.
- ZOU, Tang-Bin et al. The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. **Molecules**, v. 21, n. 1, p. 72, 2016.