

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**

**JÉSSICA CRISTINA VERUS VILLANOVA**

**Potencial de aplicação de peptídeos bioativos, obtidos a partir de *Tenebrio molitor*, para aplicação na nutrição de peixes: Propriedades físico-químicas, capacidade antioxidante e atividade antimicrobiana**

**Uruguiana  
2022**

**JÉSSICA CRISTINA VERUS VILLANOVA**

**Potencial de aplicação de peptídeos bioativos, obtidos a partir de *Tenebrio molitor*, para aplicação na nutrição de peixes: Propriedades físico-químicas, capacidade antioxidante e atividade antimicrobiana**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Tecnologia em Aquicultura da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Tecnólogo em Aquicultura.

Orientador(a): Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fernanda Rodrigues Goulart Ferrigolo

Coorientador(a): Dr.<sup>a</sup> TAE Alexandra Pretto

**Uruguiana  
2022**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais).

V717p Villanova, Jéssica Cristina Verus  
Potencial de aplicação de peptídeos bioativos, obtidos a partir de *Tenebrio molitor*, na nutrição de peixes: Propriedades físico-químicas, capacidade antioxidante e atividade antimicrobiana / Jéssica Cristina Verus Villanova.

61 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) --  
Universidade Federal do Pampa, AQUICULTURA, 2022.

"Orientação: Fernanda Rodrigues Goulart Ferrigolo".

1. Peptídeos bioativos. 2. Nutrição de peixes. 3. *Tenebrio molitor*. I. Título.

**JÉSSICA CRISTINA VERUS VILLANOVA**

**Potencial de aplicação de peptídeos bioativos, obtidos a partir de Tenebrio molitor, na nutrição de peixes: Propriedades físico-químicas, capacidade antioxidante e atividade antimicrobiana**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Tecnologia em Aquicultura da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Tecnólogo em Aquicultura.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 12 de agosto de 2022.

Banca examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fernanda Rodrigues Goulart Ferrigolo

Orientadora  
(UNIPAMPA)

---

Prof. Dr. Carlos Frederico Ceccon Lanes

(UNIPAMPA)

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Caroline Sefrin Speroni  
(UNIPAMPA)



Assinado eletronicamente por **FERNANDA RODRIGUES GOULART FERRIGOLO, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 12/08/2022, às 09:21, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **CARLOS FREDERICO CECCON LANES, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 12/08/2022, às 09:22, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **CAROLINE SEFRIN SPERONI, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 12/08/2022, às 09:23, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 0893222 e o código CRC 4AC57B93.

---

Dedico este trabalho a Deus, minha família e a todos aqueles que se envolveram nesse trabalho.

É mais produtivo viver com o peso da busca, que com o vazio da ignorância!

Pedro Loos

## **AGRADECIMENTO**

Agradeço primeiramente à Deus, que tem sido meu sustento dia e noite. O seu amor me alcançou, transformou e trouxe sentido a minha vida, e agora vivo só para ele.

Aos meus pais, Gilberto e Bernardete, agradeço pela educação, amor, carinho, por serem meu suporte em toda a graduação e me incentivarem nos momentos difíceis.

Ao meu companheiro, João Marcos e minha prima Vitória por todo amor e apoio de sempre.

À minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fernanda Rodrigues Goulart Ferrigolo, agradeço profundamente pela oportunidade concedida. Obrigada por sua orientação, paciência, compreensão, ensinamentos, atenção e confiança durante todo tempo.

À minha coordenadora Dr.<sup>a</sup> Alexandra Pretto, por todos os ensinamentos, sua amizade, dedicação, e auxílio nas análises deste trabalho.

As minhas amigas, Andressa Bitencourt e Kimberly Dias que sem elas eu não teria chegado até aqui, agradeço pela amizade verdadeira, da graduação para a vida. E ao meu amigo Eduardo Benites, agradeço pelas palavras de apoio e pensamento positivo em toda nossa vida acadêmica.

Aos meus colegas Sérgio, Priscilla e Rejane pela disponibilidade e ajuda na realização das análises.

Aos professores do curso de Tecnologia em Aquicultura, que em sua totalidade contribuíram para a minha formação profissional.

Por fim agradeço a todos que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

**MUITO OBRIGADA!**

“Quanto mais me aprofundo na Ciência  
mais me aproximo de Deus.”

Albert Einstein.



## RESUMO

A aquicultura se destaca pela produção de proteína de boa qualidade em sistemas mais sustentáveis, e trazendo segurança alimentar. Contudo, a intensificação da produção, aliada a falta de boas práticas de manejo podem gerar estresse aos animais e com isso facilitar a entrada de doenças e parasitas. Estratégias têm sido adotadas a fim de garantir o aumento da produção e manter a saúde dos animais, como o uso dos antibióticos, os quais têm sido aplicados equivocadamente em função dos seus impactos negativos. A obtenção de peptídeos bioativos a partir de insetos está sendo destaque em pesquisas, que mostraram atividade antioxidante, antibacteriana e melhorias no estado de saúde dos peixes. Por essa razão o *Tenebrio molitor* é um potencial substrato para obtenção de peptídeos bioativos, que podem ser incluídos na ração de organismos aquáticos como substitutos aos antibióticos, atuando no combate a infecções bacterianas, patógenos e fortalecendo o sistema imunológico dos animais. O objetivo deste trabalho foi padronizar uma metodologia para obtenção de peptídeos bioativos a partir de *T. molitor* para uso na nutrição de peixes. As larvas produzidas no Laboratório de Biodiversidade Animal da Unipampa foram parcialmente secas (55°/48 h) para obtenção da farinha, antes da extração de lipídeos com hexano. A farinha de tenébrio desengordurada foi pré-incubada com água destilada a 55°C por 30 minutos. Após a pré-incubação, foram avaliados os seguintes ensaios, utilizando enzima Alcalase: **1)** 20 µL enzima p/ 50 mL, por 3 h; **2)** 40 µL enzima p/ 50 mL, por 3 h; **3)** 20 µL enzima p/ 50 mL, por 4 h; **4)** 40 µL enzima p/ 50 mL, por 4 h; **5)** 20 µL enzima p/ 50 mL, por 8 h; **6)** 40 µL enzima p/ 50 mL, por 8 h; Todos os testes foram realizados a 55°C e o pH ajustado a 7,0 com NaOH (0,1 N). Após a hidrólise, a enzima foi inativada e a solução centrifugada. O grau de hidrólise (GH) foi superior nos ensaios 5 (8,14±0,04%) e 6 (8,38±0,08%) onde foi aplicado maior tempo de duração de hidrólise. O conteúdo de glicogênio foi superior para os peptídeos bioativos em relação à amostra *in natura*. Já a capacidade antioxidante foi 12 a 14% menor nos ensaios 6 e 5. Os peptídeos bioativos não foram efetivos para impedir o crescimento microbiano. Esse trabalho com peptídeos produzidos a partir de *T. molitor* é promissor e traz resultados inovadores, que permitem dar continuidade em trabalhos futuros com grande potencial para inclusão em dietas para peixes, podendo ser otimizada a metodologia de hidrólise.

Palavras-Chave: Peptídeos bioativos; *Tenebrio molitor*; Antimicrobianos naturais; Antioxidante;

## ABSTRACT

Aquaculture stands out for producing good quality protein in more sustainable systems, and bringing food security. However, the intensification of production, combined with the lack of good management practices, can generate stress for the animals and thus facilitate the entry of diseases and parasites. Strategies have been adopted in order to guarantee increased production and maintain the health of animals, such as the use of antibiotics, which have been wrongly applied due to their negative impacts. Obtaining bioactive peptides from insects is being highlighted in research, which has shown antioxidant, antibacterial activity and improvements in the health status of fish. For this reason, *Tenebrio molitor* is a potential substrate for obtaining bioactive peptides, which can be included in the diet of aquatic organisms as a substitute for antibiotics, acting in the fight against bacterial infections, pathogens and strengthening the immune system of animals. The objective of this work was to standardize a methodology for obtaining bioactive peptides from *T. molitor* for use in fish nutrition. Larvae produced at Unipampa Animal Biodiversity Laboratory were partially dried (55°/48 h) to obtain flour, before lipid extraction with hexane. The defatted tenebrium flour was pre-incubated with distilled water at 55°C for 30 minutes. After pre-incubation, the following assays were evaluated using Alcalase enzyme: 1) 20 µL enzyme per 50 mL, for 3 h; 2) 40 µL enzyme per 50 mL, for 3 h; 3) 20 µL enzyme per 50 mL, for 4 h; 4) 40 µL enzyme per 50 mL, for 4 h; 5) 20 µL enzyme per 50 mL, for 8 h; 6) 40 µL enzyme per 50 mL, for 8 h; All tests were performed at 55°C and the pH adjusted to 7.0 with NaOH (0.1N). After hydrolysis, the enzyme was inactivated and the solution centrifuged. The degree of hydrolysis (GH) was higher in assays 5 (8.14±0.04%) and 6 (8.38±0.08%) where longer hydrolysis duration was applied. The glycogen content was higher for the bioactive peptides compared to the in natura sample. The antioxidant capacity was 12 to 14% lower in trials 6 and 5. Bioactive peptides were not effective in preventing microbial growth. The peptides produced from *T. molitor* have great potential for inclusion in fish diets, and the hydrolysis methodology can be optimized.

Keywords: Bioactive peptides; *Tenebrio molitor*; Natural antimicrobials; Antioxidant;

## LISTA DE FIGURAS

### Contextualização

Figura 1 Ciclo de desenvolvimento do *Tenebrio molitor*.....20

### Artigo

Figura 1 Larvas de *Tenebrio molitor* produzidas no Laboratório de Biodiversidade Animal da Universidade Federal do Pampa .....27

Figura 2 Níveis de glicogênio de *Tenebrio molitor* in natura e peptídeos bioativos...33

Figura 3 Crescimento bacteriano in vitro de *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella* sp. ....41

Figura 4 Crescimento bacteriano in vitro de *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Proteus* sp .....42

### Apêndices

Figura 1 Avaliação antimicrobiana dos peptídeos bioativos contra *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Proteus* sp.....55

Figura 2 Avaliação antimicrobiana dos peptídeos bioativos contra *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella* sp. ....55

Figura 3 Realização da análise antimicrobiana .....56

Figura 4 Realização da análise de gordura .....56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Caracterização físico-química de larvas de <i>Tenebrio molitor</i>	29
Tabela 2: Grau de hidrólise enzimática de <i>Tenebrio molitor</i> desengordurado, utilizando enzima Alcalase®	34
Tabela 3: Capacidade antioxidante total de peptídeos bioativos obtidos a partir de <i>Tenebrio molitor</i>	36

## **SUMÁRIO**

<b>1 CONTEXTUALIZAÇÃO</b>	<b>15</b>
1.1 Antimicrobianos naturais na nutrição de peixes	16
1.2 Peptídeos bioativos	17
1.3 Hidrólise enzimática para obtenção de peptídeos bioativos	18
1.4 <i>Tenebrio molitor</i>	19
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>21</b>
2.1 Objetivo geral:	21
2.2 Objetivos específicos:	21
<b>3 ARTIGO</b>	<b>22</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>24</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>26</b>
2.1 Larvas de <i>Tenebrio molitor</i>	26
2.3 Ensaios de obtenção dos peptídeos bioativos	27
2.4 Glicogênio	28
2.5 Grau de hidrólise	28
2.6 Capacidade antioxidante total dos peptídeos	29
2.7 Avaliação da capacidade antimicrobiana	29
2.8 Análise estatística	30
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>30</b>
3.1 Composição química das larvas de <i>Tenebrio molitor</i>	30
3.2 Níveis de glicogênio em <i>T. molitor</i> (in natura e peptídeos bioativos)	31
3.3 Grau de hidrólise dos peptídeos bioativos	34
3.4 Capacidade antioxidante dos peptídeos bioativos	37
3.5 Capacidade antimicrobiana dos peptídeos bioativos	39
<b>4 CONCLUSÃO</b>	<b>42</b>
REFERÊNCIAS	44
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>50</b>
REFERÊNCIAS	51
APÊNDICES:	55

## 1 CONTEXTUALIZAÇÃO

A Pesca e Aquicultura mundial atingiram o recorde de aproximadamente 214 milhões de toneladas em 2020. Só a aquicultura (cultivo de organismos aquáticos) contribuiu com cerca de 88 milhões de toneladas e 265 bilhões de dólares, e a expectativa é que esses números continuem a crescer (FAO, 2022). Em 2021, a piscicultura brasileira apresentou crescimento de 4,7%, totalizando 841.005 toneladas (PEIXE BR, 2022). Grande parte da produção aquícola brasileira é realizada em águas continentais (reservatórios, viveiros escavados, barragens, etc.), o que torna a aquicultura marinha somente exploratória e restrita a regiões de litoral (PEDROZA FILHO; ROUTLEDGE, 2016).

Atualmente, a pandemia do COVID-19 refletiu-se negativamente nos sistemas alimentares, acarretando em atrasos na promessa de superar a grande fome mundial até o ano de 2030, conforme relatório publicado pela FAO (FAO, 2020). Em paralelo, a aquicultura se destaca como a produção de proteína de boa qualidade em sistemas mais sustentáveis, o que pode ajudar a reverter esse quadro, garantindo a segurança alimentar, principalmente em um cenário pandêmico. Além disso, vem se estabelecendo de modo a suprir a demanda de mercado, investindo em novas tecnologias de criação e proteção ambiental. Contudo, a intensificação da produção, aliada a falta de boas práticas de manejo tais como altas densidades de estocagem, qualidade da água e nutrição de baixa qualidade podem gerar estresse aos animais (AWAD *et al.*, 2017) e com isso facilitar a entrada de doenças e parasitas (ISHIKAWA *et al.* 2020).

Nesse contexto, várias estratégias têm sido adotadas a fim de garantir o aumento da produção e ao mesmo tempo manter a saúde dos animais, incluindo o uso de antibióticos, os quais têm sido aplicados equivocadamente como forma preventiva de doenças e como promotores de crescimento (GOULART *et al.*, 2020). Nesse sentido, o uso desses fármacos vem sendo restringido em função dos seus impactos negativos, como desequilíbrio no ambiente aquático, predomínio de bactérias resistentes, toxicidade e capacidade de acumular resíduos nos tecidos de peixes (CARVALHO *et al.*, 2016).

Para reverter tais consequências buscam-se alternativas para a substituição desses medicamentos, que sejam ecologicamente corretos, e que ofereçam

sustentabilidade promissora para a prevenção e controle de doenças na aquicultura, e além disso, atuam como prebióticos, estimulando benéficamente o sistema imunológico e aumentando a tolerância ao estresse e a resistência às doenças nos animais (MOHAMMADI *et al.*, 2020; HOSEINIFAR *et al.*, 2015). A partir disso, os peptídeos bioativos chegam como alternativa de substituição aos antibióticos, pois eles são compostos por pequenos fragmentos de aminoácidos e podem ser usados como ingredientes funcionais ou nutracêuticos (MATOS 2021; DE CASTRO, 2015).

### **1.1 Antimicrobianos naturais na nutrição de peixes**

Alterações no sistema imunológico dos peixes estão associadas a fatores extrínsecos e intrínsecos, como por exemplo: superlotação, manuseio, temperatura, qualidade da água e má nutrição. Quando esses fatores afetam a manutenção do equilíbrio corporal ocorre uma situação de estresse, gerando uma cascata de processos fisiológicos (URBINATI, 2014). As respostas imunológicas alteram conforme a intensidade e duração desse agente estressor causado ao peixe (RIBEIRO; URBINATI, 2019; AWAD *et al.*, 2017). A manutenção de condições adequadas de produção pode evitar estresse, amenizando os fatores, mantendo sua capacidade imunológica e dificultando a manifestação de infecções e doenças microbiológicas e parasitárias (QUEIROZ, 2016).

Os antibióticos são agentes antimicrobianos eficazes, que desempenham papel importante no tratamento de doenças, estando entre os medicamentos mais amplamente distribuídos para a saúde e o manejo animal (GASTALHO *et al.*, 2014). No entanto, esses antimicrobianos podem trazer consequências irreversíveis tanto para a saúde humana, como para o meio ambiente. Quando acumulam-se no solo e ocorre lixiviação, eles são escoados superficialmente para os corpos hídricos, causando a contaminação de ambientes aquáticos e o aparecimento de cepas bacterianas resistentes (VIEIRA & PEREIRA, 2016; AWAD *et al.*, 2017). Conforme, CABELLO (2006), as bactérias no ambiente aquático são as primeiras a desenvolver fatores de resistência aos antibióticos, já que ficam expostas a altas concentrações desses compostos.

No Brasil, cepas bacterianas muito resistentes aos antibióticos têm sido encontradas com frequência, as quais são responsáveis por altas taxas de mortalidade em peixes, como exemplo, *Klebsiella pneumoniae* (VANECCI-SILVA *et al.*,



2022) e *Streptococcus agalactiae* (MILLER; HARBOTTLE, 2018). Isolados do gênero *Aeromonas* e da família *Enterobacteriaceae* são talvez as mais estudadas, pelo potencial patogênico que apresentam. *Aeromonas hydrophila* comumente pode causar septicemia e mortalidade em peixes e *Aeromonas salmonicida* causa furunculose em salmonídeos, enquanto em outros peixes, causam septicemia e infecções na pele e músculos (GASTALHO *et al.*, 2014).

Assim, tem havido enorme motivação para encontrar substitutos naturais dos antibióticos, a fim de contribuir para a sustentabilidade ambiental, reduzir a resistência aos antibióticos e melhorar a saúde dos peixes.

Alguns estudos recentes mostraram atividade antimicrobiana de produtos naturais usados para controlar patógenos de peixes, como por exemplo o óleo de coco e o ácido láurico (COUTO *et al.*, 2021.; NITBANIA *et al.*, 2016). O ácido láurico reduziu o crescimento bacteriano de *Aeromonas hydrophila* e causou mortalidade de *Ichthyophthirius multifiliis*, o óleo de coco mostrou-se eficiente para controlar o desenvolvimento de microrganismos, devido a alta concentração de ácido láurico na sua composição (COUTO *et al.*, 2021). Descobriu-se também que o ácido láurico em concentrações de 5%, é capaz de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* (NITBANIA *et al.*, 2016). A utilização de própolis como aditivo nutricional foi objetivo de pesquisas, que comprovaram sua atividade antimicrobiana e aumento da resistência de diversas doenças vivenciadas durante a aquicultura intensiva, conforme revisado por FARAG *et al.* (2021). Óleos essenciais de plantas também já foram avaliados quanto a sua capacidade antioxidante e atividade antimicrobiana sobre *Pseudomonas* spp. isoladas de peixes, demonstrando ser uma fonte potencial de antibacterianos naturais a serem utilizados como compostos para melhorar a qualidade microbiológica de peixes de água doce (KAČÁNIOVÁ, 2017).

## **1.2 Peptídeos bioativos**

Peptídeos bioativos se referem a frações específicas de proteínas ou curtos segmentos de aminoácidos que promovem positivamente várias funções biológicas (CASTRO; SATO, 2015; DAMASCENO *et al.*, 2016). São ativos quando hidrolisados por peptidases durante o processamento de alimentos e/ou durante a digestão gastrointestinal (SOUZA JÚNIOR, 2019). Podem ser obtidos a partir de várias fontes

de proteínas animais ou vegetais, tais como soja, leite, ovos, peixes, e seus subprodutos, geralmente apresentando de 2-20 resíduos de aminoácidos e massa < 6 KDa (HALIM *et al.*, 2016; CASTRO; SATO, 2015). Ainda apresentam vantagens de baixo custo, alta atividade, fácil absorção e utilização pelas células (CHEW *et al.*, 2019; SARMADI; ISMAIL, 2010).

Os peptídeos bioativos são considerados nutracêuticos, uma alternativa para a prevenção e o tratamento de diferentes doenças, por terem amplo espectro de ação antimicrobiana, além de atividade antioxidante, anti-hipertensiva, efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores (SARMADI; ISMAIL, 2010; HALIM *et al.*, 2016). Os peptídeos bioativos têm sido o foco de inúmeras pesquisas, e podem ser considerados o futuro para a indústria da aquicultura. Eles são capazes de diminuir a produção de espécies reativas de oxigênio, e proteger as células contra o estresse oxidativo induzido através da neutralização, eliminação, e/ou sequestro de radicais livres (TONOLO *et al.*, 2019; CHEW *et al.*, 2019).

Ao ser suplementado um pequeno peptídeo antimicrobiano, contendo 11 resíduos de aminoácidos (CM11) na dieta de *Danio rerio*, os peixes que receberam quantidades pequenas deste peptídeo na ração e mostraram o sistema imunológico fortalecido e melhoraram o estado de saúde. Após serem desafiados com *Streptococcus iniae* e *Yersinia ruckeri*, os peixes foram capazes de resistir à bactérias patogênicas aquáticas e aumentar a atividade das enzimas oxidativas (RASHIDIAN *et al.*, 2021). Devido a esses achados, os peptídeos podem apresentar alta relevância na dieta de peixes e por isso, pesquisas relacionadas a esses temas devem ser desenvolvidas.

### **1.3 Hidrólise enzimática para obtenção de peptídeos bioativos**

A hidrólise enzimática atua para que sequências de aminoácidos sejam quebradas e esses aminoácidos possam exercer funções específicas no organismo, formando os peptídeos bioativos. Essa técnica tem sido a mais utilizada, por permitir a obtenção de compostos com melhores propriedades tecnofuncionais e biológicas (NONGONIERMA; FITZGERALD, 2017). Isso ocorre por conta de enzimas chamadas de proteases capazes de hidrolisar as ligações peptídicas das proteínas (CASTRO; SATO, 2015).

A hidrólise enzimática é aplicada quando se deseja melhorar a disponibilidade dos peptídeos bioativos presentes nas moléculas de proteínas (SOUZA JÚNIOR, 2019), sendo realizada sob condições de pH entre 6 a 8 e temperatura de 40 a 60°C. Apresenta vantagens comparadas a outras hidrólises, como: especificidade, controle do grau de hidrólise, condições moderadas de ação, disponibilidade comercial em larga escala, custo moderado, diminuição no teor de sal e formação mínima de subprodutos (CLEMENTE, 2000). Sua desvantagem é o aparecimento de sabor amargo no processo da catálise, supostamente relacionado à liberação de grupamentos hidrofóbicos encontrados no interior das proteínas (CHEW *et al.*, 2019).

Durante o processo de hidrólise, as proteínas são clivadas em peptídeos menores e aminoácidos livres. O grau de hidrólise é uma medida da extensão da hidrólise de proteínas, pois quanto maior o grau de hidrólise, mais proteínas foram clivadas em peptídeos ou aminoácidos e mais peptídeos potencialmente ativos podem ser obtidos (CHEW *et al.*, 2019).

#### **1.4 *Tenébrio molitor***

Com a aquicultura se desenvolvendo significativamente, a indústria de rações depende de ingredientes com valor nutricional de alta qualidade a preços acessíveis. A farinha de peixe é o principal insumo utilizado nas rações de organismos aquáticos (SÁNCHEZ-MUROS *et al.*, 2015), por conta da sua alta digestibilidade, perfil de aminoácidos essenciais e boa palatabilidade. O problema está na alta procura pela farinha de peixe, diminuindo seus estoques e elevando seus preços, fazendo motivar pesquisadores a buscar um substituto que possa tornar a produção aquícola econômica e ambientalmente sustentável (DANIEL, 2018; SHAFIQUE *et al.*, 2021; BARROSO *et al.*, 2014).

Objetivando esse pensamento, a criação de insetos como substituto de fonte proteica convencional ganha espaço nos últimos anos, devido a pequena área utilizada para sua produção e por serem capazes de converter diversos resíduos industriais sem valor agregado em proteína, evitando desperdícios e poluição ambiental (GRAU *et al.*, 2017). Estudos experimentais utilizaram insetos na formulação de rações para peixes como, mosca soldado-negro (LANES *et al.*, 2021), e farinha de tenébrio (SANTOS JUNIOR, 2018), e comprovaram que a inclusão total

ou parcial dessas fontes de proteína resulta em melhor desempenho nutricional e zootécnico.

Dentre as espécies produzidas para fins de inclusão nas rações, o *Tenebrio molitor*, pertencente à família *Tenebrionidae*, vem se destacando como fonte de proteína de baixo custo e com alto valor nutricional, tanto na área da indústria aquícola como na nutrição humana (GRAU *et al.*, 2017). O tenébrio é uma praga de cereais, um inseto que infestam grãos armazenados em condições de armazenamento inadequadas, apresenta uma metamorfose completa, passando pelas fases de ovo, larva, pupa e besouro (figura 1) (CASTRO, 2021). Apresenta características interessantes em relação às frações de aminoácidos essenciais, sendo abundante em isoleucina, leucina, lisina e em lipídios e ácidos graxos, dependendo do seu estágio de vida (SHAFIQUE *et al.*, 2021; TANG *et al.*, 2018).

A obtenção de peptídeos bioativos a partir de insetos foi destaque de algumas pesquisas. Os peptídios obtidos do bicho-da-seda (*Bombyx mori*) apresentou atividade antioxidante (LIU *et al.*, 2016), larvas-da-farinha (*Tenebrio molitor*) mostraram atividade anti-hipertensiva (DAI *et al.*, 2013), e mosca soldado-negro (*Hermetia illucens*) atividade antioxidante (MINTAH *et al.*, 2019). Por essa razão o *T. molitor* é um potencial substrato para obtenção de peptídeos bioativos, podendo ser incluído na ração de organismos aquáticos, desta forma atuando com suas moléculas bioativas na nutrição de peixes, substituindo antibióticos, prevenindo contra patógenos e estimulando o sistema imunológico dos peixes para combater infecções bacterianas.

Figura 1 Ciclo de desenvolvimento do *Tenebrio molitor*



Fonte: Autoria própria

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral:**

Obter peptídeos bioativos a partir de larvas do *Tenebrio molitor* para o uso futuro na nutrição de peixes.

### **2.2 Objetivos específicos:**

- a) Avaliar o grau de hidrólise nos ensaios aplicados para obtenção de peptídeos bioativos;
- b) Avaliar as propriedades físico-químicas dos peptídeos bioativos;
- c) Avaliar a capacidade antioxidante (FRAP) dos peptídeos bioativos;
- d) Avaliar a atividade antimicrobiana dos peptídeos bioativos contra as seguintes bactérias: *Pseudomonas sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Proteus sp.*

### **3 ARTIGO**

Artigo a ser submetido à revista Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology

**Obtenção de peptídeos bioativos a partir de *Tenebrio molitor*: avaliação das propriedades físico químicas, antioxidantes e capacidade antimicrobiana**

**Obtaining bioactive peptides from *Tenebrio molitor*: evaluation of physical properties, antioxidants and antimicrobial capacity**

Jéssica Cristina Verus Villanova, Alexandra Pretto, Kimberly Costa Dias, Priscilla Espindola da Silva, Sergio Domingos Silveira Serra, Vanessa Bley Ribeiro, Carlos Frederico Ceccon Lanes, Fernanda Rodrigues Goulart Ferrigolo

Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Curso Superior de Tecnologia em Aquicultura, Campus Uruguaiana, Uruguaiana/RS – Brasil

## ABSTRACT

The objective of this study was to standardize a methodology for obtaining bioactive peptides from *Tenebrio molitor* and to characterize them. *T. molitor* larvae were partially dried (55°/48 h) to obtain flour, before lipid extraction with hexane. The defatted tenebrium flour was pre-incubated with distilled water at 55°C for 30 minutes. After pre-incubation, the following assays were evaluated: 1) 20 µL enzyme per 50 mL, for 4 h; 2) 40 µL enzyme per 50 mL, for 4 h; 3) 20 µL enzyme per 50 mL, for 3 h; 4) 40 µL enzyme per 50 mL, for 3 h; 5) 20 µL enzyme per 50 mL, for 8 h; 6) 40 µL enzyme per 50 mL, for 8 h; All tests were performed at 55°C and the pH adjusted to 7.0 with NaOH (0.1N). After hydrolysis, the enzyme was inactivated and the solution centrifuged. Fat extraction concentrated the crude protein in the flour. The degree of hydrolysis (GH) was higher in assays 5 (8.14±0.04%) and 6 (8.38±0.08%) where longer hydrolysis duration was applied. The glycogen content was higher for the bioactive peptides compared to the in natura sample. The antioxidant capacity was 12 to 14% lower in assays 6 and 5, and the peptides generated did not prevent bacterial growth. The peptides from *T. molitor* have great potential for inclusion in fish diets, which is confirmed by the antioxidant capacity.

Keywords: Bioactive peptides; mealworm; Natural antimicrobials; Antioxidant;

## 1 INTRODUÇÃO

Sabe-se que a aquicultura não é apenas importante na geração de recursos financeiros e empregos, mas ela também contribui para a segurança alimentar e desenvolvimento social de muitas regiões e países, inclusive o Brasil (Esteban, 2012).

Nesse sentido, para que a piscicultura se torne uma atividade competitiva e atinja altos índices produtivos, há a necessidade de intensificação e, com isso, diversos fatores, incluindo a superlotação, práticas de manejo, temperatura desfavorável, má nutrição e qualidade da água favorecem o estresse dos animais (Awad et al., 2017). O sistema imunológico dos peixes é diretamente influenciado por fatores do ambiente de criação. Quando estes fatores rompem o estado de homeostase corporal, o organismo atinge uma situação de estresse, ocorrem alterações fisiológicas e o animal fica suscetível ao aparecimento de doenças (Urbinati et al., 2014). Mais especificamente, nessa condição a produção de radicais livres e/ou espécies reativas ao oxigênio (átomos ou moléculas altamente reativos com constituintes celulares) pode ser aumentada e superar a capacidade de defesa antioxidante das células, o que leva ao indesejável estado de estresse oxidativo (Lushchak, 2011). Todas estas alterações bioquímicas e fisiológicas são capazes de perturbar o sistema imunológico dos peixes e favorecer o desenvolvimento de doenças.

Como forma de prevenção e controle de patógenos, o uso de antibióticos em sistemas de produção intensiva tem sido adotado rotineiramente, porém, esses antimicrobianos são responsáveis por diversos efeitos negativos, além de serem responsáveis pelo desenvolvimento de cepas bacterianas resistentes, acumular resíduos em tecidos comestíveis e no meio ambiente, e atenuar o sistema imunológico (Hoseinifar et al., 2015). Como resultado, buscam-se alternativas ecologicamente



corretas para o uso de antibióticos, que ofereçam sustentabilidade promissora para a prevenção e / ou controle de doenças na aquicultura (Hoseinifar et al., 2015; Awad et al., 2017; Mohammadi et al., 2020; Yousef et al., 2020).

Neste contexto, os compostos funcionais bioativos são considerados o futuro da indústria aquícola. Isso porque, por meio da gestão preventiva da saúde através de práticas alimentares, os animais aquáticos podem desviar mais energia para o crescimento e reduzir as reservas de energia biológica necessárias para combater doenças ou resistência ao estresse (Salomón et al. 2020).

Dentre os compostos funcionais bioativos, estudos têm revelado que peptídeos obtidos de fontes proteicas de origem vegetal e animal melhoram a eficiência no uso dos nutrientes, aumentando a absorção de aminoácidos e minerais, além de promoverem a síntese de proteínas e a atividade de enzimas digestivas, consequentemente levando ao aumento no crescimento (Hao et al., 2020). A inclusão de compostos nitrogenados de baixo peso molecular em dietas para peixes também promovem vários benefícios para a saúde do animal (Hao et al., 2020), pois a quebra das proteínas em cadeias peptídicas menores (contendo de 2 a 20 aminoácidos) produzirá um composto bioativo com várias funções fisiológicas. Com propriedades antioxidantes, estudos mostram que hidrolisados proteicos atuam contra radicais livres, mas além disso, apresentam atividade antimicrobiana, citomoduladora, promovem reações fisiológicas imunomodulatórias, função prebiótica e são hipocolesterolêmicos (Halim et al., 2016).

Conforme Samaranayaka & Li-Chan (2011), a hidrólise através do uso de enzimas tem sido a principal forma para obtenção de peptídeos a partir de proteínas. Diversas matérias primas como peixe, leite, ovos, soja, trigo, entre outras fontes proteicas, têm sido amplamente estudados como ingredientes potenciais para produção de peptídeos. Dentre as fontes potenciais promissoras para obtenção de

peptídeos, insetos como o *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758) merecem destaque devido à abundância dessa matéria prima, a qual é rica em proteínas e apresenta elevados teores de aminoácidos essenciais como a lisina.

Na aquicultura, a farinha de larvas de tenébrio já tem sido incluída na dieta de dourada (*Sparus aurata*, Linnaeus 1758), robalo (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus 1758), truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792), bagre africano (*Clarias gariepinus*, Burchell, 1822), tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1758) e tambaqui (*Colossoma macropomum*, CUVIER, 1816) como potencial substituto para a farinha de peixe (revisado por Henry et al., 2015, Lira, 2015; Tubin, 2017). Porém são raros os estudos de peptídeos bioativos a partir de *Tenebrio molitor*.

O objetivo deste estudo é aplicar metodologias para obtenção de peptídeos bioativos a partir de *Tenebrio molitor* e avaliar suas propriedades físico-químicas, atividade antioxidante e atividade antimicrobiana.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Larvas de *Tenebrio molitor***

As larvas de *Tenebrio molitor* foram produzidas no Laboratório de Biodiversidade Animal da Universidade Federal do Pampa (Figura 1), sendo alimentadas com ração comercial para frangos, composta por milho moído, farelo de glúten de milho, farelo de soja e farelo de arroz, contendo  $19,96 \pm 0,70\%$  de proteína bruta (PB),  $3,83 \pm 0,13\%$  de lipídeos,  $89,53 \pm 1,16\%$  de matéria seca (MS) e  $10,28 \pm 0,98\%$  de matéria mineral (MM). As larvas foram criadas até atingir o tamanho 2 cm, o que levou cerca de 80 dias. As larvas de *T. molitor* foram moídas e avaliadas quanto à composição bromatológica em relação a matéria seca, matéria mineral e proteína bruta, segundo as metodologias propostas pela AOAC (1995) e gordura de acordo com Bligh & Dyer (1959).

Figura 1 Larvas de *Tenebrio molitor* produzidas no Laboratório de Biodiversidade Animal da Universidade Federal do Pampa



Fonte: Autoria própria

### 2.3 Ensaios de obtenção dos peptídeos bioativos

As larvas parcialmente secas (55°/48 horas) foram moídas em liquidificador para obtenção de farinha. Após esta etapa, foram extraídos os lipídeos com solvente orgânico hexano (proporção 1:2 p:v), realizando-se quatro lavagens de 30 minutos cada uma (Goulart et al., 2013). A seguir, a farinha de tenébrio desengordurada foi homogeneizada e pré-incubada em água destilada (proporção 1:10 p:v) a 55°C por 30 minutos. Após a pré-incubação, foram feitos os seguintes ensaios, utilizando a enzima Alcalase® (densidade de 1,17 g/ml):

Ensaio 1: adição de 20 µL de enzima para cada 50 mL de volume, por 3 horas a 55°C;

Ensaio 2: adição de 40 µL de enzima para cada 50 mL de volume por 3 horas a 55°C;

Ensaio 3: adição de 20 µL de enzima para cada 50 mL de volume, por 4 horas a 55°C;

Ensaio 4: adição de 40 µL de enzima para cada 50 mL de volume, por 4 horas a 55°C;

Ensaio 5: adição de 20  $\mu\text{L}$  de enzima para cada 50 mL de volume por 8 horas a 55°C;

Ensaio 6: adição de 40  $\mu\text{L}$  de enzima para cada 50 mL de volume por 8 horas a 55°C;

Em todos os ensaios acima o pH foi ajustado a 7,0 com NaOH (0,1 N) para ação enzimática. Passada a etapa de hidrólise, a enzima foi inativada por aquecimento (95°C por 15 minutos). Após, a mistura foi resfriada até 20-25°C em banho de gelo. Amostras hidrolisadas foram centrifugadas (8000 *rpm* por 20 minutos) a fim de isolar materiais insolúveis dos peptídeos solúveis. A metodologia utilizada neste processo segue o proposto por Tang et al. (2018). O sobrenadante da amostra líquida foi removido e armazenado até a realização de análises laboratoriais.

## 2.4 Glicogênio

Os níveis de glicogênio nas larvas de tenébrio *in natura* e nos peptídeos foram determinados de acordo com a metodologia descrita por Bidinotto et al. (1997). Foi adicionado junto a amostra de 50 mg, KOH e etanol para a hidrólise e precipitação do glicogênio, seguida da determinação direta de glicose através do método hidrolítico por fenol-ácido sulfúrico. A curva padrão foi construída com solução de glicose (50 a 200  $\mu\text{M}$ ) e os dados expressos como  $\mu\text{mol}$  glicose/g de amostra.

## 2.5 Grau de hidrólise

Após a hidrólise, uma solução de ácido tricloroacético (TCA) 20% foi adicionada igualmente ao sobrenadante e centrifugado a 8000 *rpm* durante 20 minutos. O conteúdo de nitrogênio do sobrenadante fresco (solução contendo 10% de TCA) foi determinado pelo método micro-Kjeldahl. A metodologia segue o proposto por Tang et al. (2018) com modificações. O grau de hidrólise foi calculado a partir da equação:

$$\text{Hidrólise enzimática (\%)} = (\text{total N na amostra}) / (\text{N solução 10\% de TCA}) \times 100$$

## 2.6 Capacidade antioxidante total dos peptídeos

A capacidade antioxidante foi avaliada através do poder de redução do ferro férrico em ferro ferroso ou método FRAP conforme a metodologia descrita por Pulido et al. (2000) com modificações. A curva padrão foi construída com sulfato ferroso hexahidratado (500 a 2000  $\mu\text{M}$ ) e os resultados expressos como equivalente de  $\mu\text{mol}$  de Fe (II) por grama de amostra.

## 2.7 Avaliação da capacidade antimicrobiana

### *Padronização dos inóculos*

Para a avaliação da capacidade antimicrobiana dos peptídeos bioativos foram realizados testes utilizando as seguintes culturas bacterianas: *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Proteus* sp. Os inóculos foram repicados em placas de PCA 24 horas antes do teste. Suspensões bacterianas foram diluídas em solução salina 10%, utilizando a escala de 0,5 McFarland (aproximadamente  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL).

### *Determinação da concentração inibitória mínima*

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada pelo método de microdiluição em caldo. Sendo definida como a menor concentração do extrato em  $\text{mg mL}^{-1}$ , capaz de inibir o crescimento microbiano. Foram preparadas uma sequência de diluições seriadas, utilizando os peptídeos do ensaio 5, por conta do maior grau de hidrólise obtido e menor quantidade de enzima utilizada, conforme descrito a seguir: proporção peptídeo: caldo Mueller Hinton (v:v): 1:2; 1:5; 1:10; 1:50; 1:100. Após, nas placas de microdiluição de 96 poços foram dispensados 50  $\mu\text{L}$  de caldo Mueller Hinton e em seguida 50  $\mu\text{L}$  de cada uma das diluições. Após esta etapa,

2 µL de cada inóculo foram adicionados a cada poço e as placas incubadas a 37°C por 24 horas. A concentração inibitória mínima foi avaliada em quadruplicata.

## **2.8 Análise estatística**

Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade, seguido de análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância.

## **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1 Composição química das larvas de *Tenebrio molitor***

Através dos resultados obtidos da composição centesimal do tenébrio *in natura* e desengordurado (Tabela 1) observou-se um aumento considerável na concentração de proteína bruta da farinha de tenébrio (+38,4%) após o processo de extração de gordura. Já, com relação aos níveis de lipídios, houve grande redução desse conteúdo (-82,5%), demonstrando que o processo químico empregado para extração da gordura foi eficiente e por consequência, concentrou o teor de proteínas da farinha. Em revisão de literatura feita por Hong et al. (2020), foi demonstrado que larvas *in natura* de *Tenebrio molitor* apresentam entre 47,0 e 60,2% de PB e 22,87 a 37,70% de gordura em sua composição centesimal. Sugere-se que esses valores oscilam em função da dieta que o inseto está recebendo. A composição nutricional das larvas de *T. molitor* citada por Hong et al. (2020) se encontra dentro dos níveis observados em nosso estudo e confirma a hipótese de que essas larvas são excelentes fontes de proteína e gordura, assim como já vem sendo destacado por pesquisas prévias.

Com relação a composição da farinha de tenébrio desengordurada, os valores encontrados para PB (62,51%) são semelhantes aos observados por Santos (2018) (66,69%) e Moyses (2021) (74,36%). Além disso, é importante destacar que esses

valores estão próximos aos da farinha de peixe (67,5%), e superiores aos níveis do farelo de soja (em média 49,4% de PB) (Hong et al., 2020). Em função disso, sugere-se que a farinha de tenébrio desengordurada é uma fonte de proteína altamente sustentável e alternativa aos ingredientes proteicos convencionais usados na nutrição aquícola, como a farinha de peixe e o farelo de soja. Quanto aos teores de matéria seca e matéria mineral, observou-se valores semelhantes na farinha *in natura* e desengordurada, demonstrando que o processo de retirada da gordura não afeta o conteúdo mineral do ingrediente.

Tabela 1: Caracterização físico-química de larvas de *Tenebrio molitor*

Amostra	Proteína bruta (%)	Matéria Seca (%)	Matéria mineral (%)	Lipídeos (%)	Carboidratos (%)
Farinha de tenébrio <i>in natura</i>	45,17±1,50	87,55±0,09	3,22±0,24	34,36±0,68	4,8
Farinha de tenébrio desengordurada	62,51±3,20	86,65±0,14	4,53±0,03	6,02±1,17	13,59

### 3.2 Níveis de glicogênio em *T. molitor* (in natura e peptídeos bioativos)

A caracterização dos níveis de glicogênio de *T. molitor in natura* e peptídeos bioativos são apresentados na Figura 2. Os resultados foram numericamente superiores para os peptídeos bioativos (152,81 µmol glicose/g de amostra) em relação à amostra *in natura* (144,08 µmol glicose/g de amostra).

Nos insetos, o glicogênio tem relação com um dissacarídeo não redutor constituído de duas unidades de glicose chamado trealose. Esse composto é encontrado na hemolinfa de insetos e constitui uma fonte de energia, especialmente

na contração do músculo durante o voo. A síntese de trealose pelos insetos é produzida no corpo gorduroso, onde também é armazenada para ser utilizada pela hemolinfa quando necessário (Lopes & Villela, 1972). Alguns autores explicam que a trealose tem a função de proteger as células durante processos de estresse, como por exemplo altas temperaturas, choque osmótico, efeitos tóxicos do etanol e desidratação (Alcarde & Basso, 1997).

Em estudo realizado por Alcarde e Basso (1997), observou-se um aumento no teor de trealose de leveduras com a aplicação de tratamento térmico (aumento de temperatura). Esses resultados corroboram com os achados em nosso estudo, pois maiores níveis de glicogênio foram observados nos peptídeos bioativos, os quais passaram por um tratamento térmico, ao final do processo de hidrólise, a fim de inativar a enzima.

Sugere-se que a trealose pode interferir no processo de secagem de peptídeos obtidos a partir de tenébrio, o que foi percebido em nosso estudo. Inicialmente pretendia-se trabalhar com amostras liofilizadas, porém através desse método de secagem (resultados não incluídos) não obtivemos amostras viáveis, para serem estudadas e empregadas na ração de peixes, devido ao seu aspecto viscoso e aderente. Isso pode ser atribuído aos elevados níveis de glicogênio (trealose) presentes tanto nas amostras *in natura* quanto nos peptídeos. Diante disso, priorizamos em trabalhar com a amostra úmida ao invés de seca, que por consequência facilitará a homogeneização dos peptídeos na ração.

Estudos com outras matérias primas, como ex. *Saccharomyces cerevisiae*, tem demonstrado uma alta resistência à desidratação, o que vem sendo atribuído ao elevado teor de trealose presente em sua célula (Eleutherio et al., 1993).

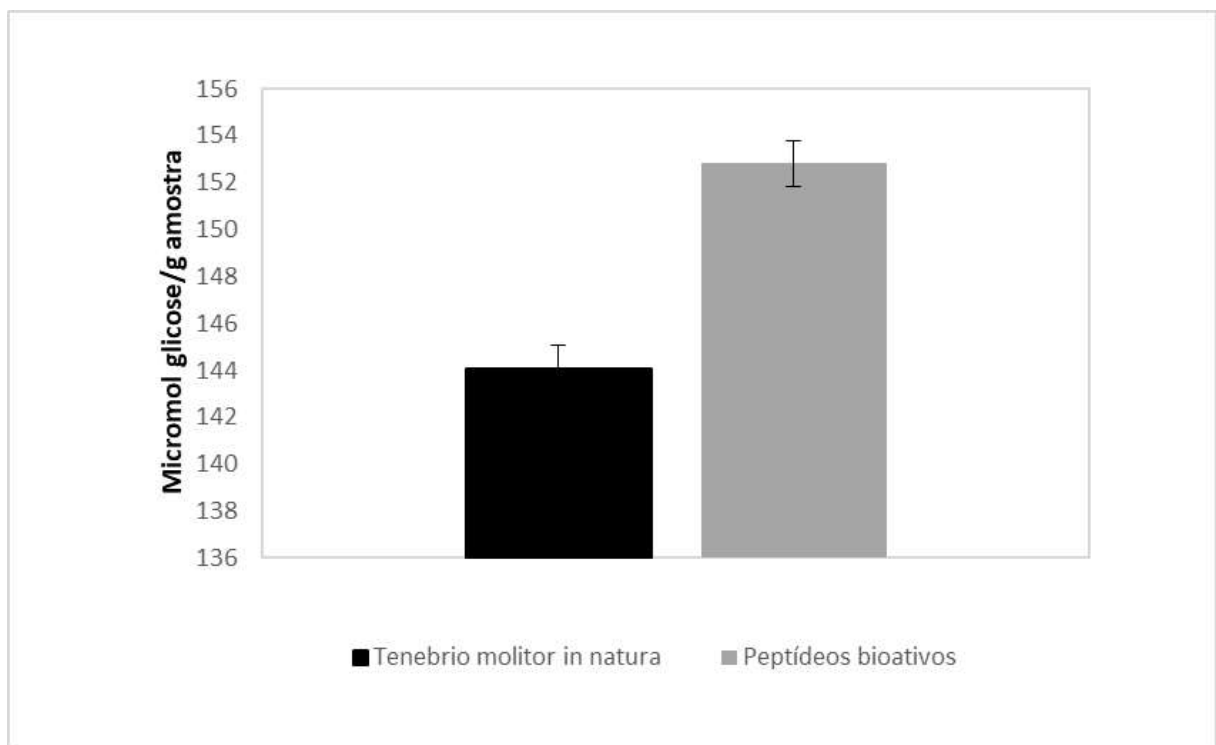
Isso se deve ao fato de que a trealose é capaz de interagir com os grupos polares das cadeias fosfolipídicas presentes na membrana plasmática. Através dessa



ligação entre a trealose e a membrana, evita-se a fragmentação lateral dos componentes da membrana, trazendo estabilização das membranas e também de proteínas, o que aumenta a resistência à desidratação (Eleutherio et al., 1993; Alcarde & Basso, 1997; Gibney et al., 2015).

A partir disso, sugere-se que estudos futuros avaliem maneiras eficientes de preservação e conservação de peptídeos bioativos obtidos a partir de *T. molitor*.

Figura 2 Níveis de glicogênio de *Tenebrio molitor in natura* e peptídeos bioativos



### **3.3 Grau de hidrólise dos peptídeos bioativos**

A tabela 2 apresenta os resultados do grau de hidrólise (GH) dos ensaios para obtenção dos peptídeos bioativos. A partir dos resultados, observou-se diferenças significativas entre os ensaios avaliados, possivelmente relacionadas com o tempo de duração da hidrólise e a concentração enzimática utilizada. Nos ensaios 1 ao 4, onde foram empregados menor tempo de duração de hidrólise (3-4h), o grau de hidrólise foi significativamente menor comparado aos ensaios 5 e 6. Além disso, observou-se que a concentração enzimática também influenciou no grau de hidrólise. No ensaio 3, em que foi empregado maior concentração de enzima, observamos maior grau de hidrólise comparado ao ensaio 1. Corroborando com os resultados do presente estudo, Centenaro et al. (2009) também observaram aumento no grau de hidrólise nos ensaios para obtenção de peptídeos quando empregadas maiores concentrações de alcalase. Conforme Kristinsson & Rasco (2000) o aumento na concentração de protease realmente se reflete em aumento no grau de hidrólise, porém os autores fazem uma observação importante ao destacar que quanto maior a quantidade de enzima utilizada, maior será o custo para a obtenção dos peptídeos.

Tabela 2: Grau de hidrólise enzimática de *Tenebrio molitor* desengordurado, utilizando enzima Alcalase®

Amostra	Grau de hidrólise (%)
Ensaio 1 <sup>1</sup>	5,19±0,10 <sup>bc</sup>
Ensaio 2 <sup>2</sup>	5,55±0,24 <sup>c</sup>
Ensaio 3 <sup>3</sup>	4,30±0,15 <sup>a</sup>
Ensaio 4 <sup>4</sup>	5,09±0,02 <sup>b</sup>
Ensaio 5 <sup>5</sup>	8,14±0,04 <sup>d</sup>
Ensaio 6 <sup>6</sup>	8,38±0,08 <sup>d</sup>

<sup>1</sup>Ensaio 1: adição de 20 µL de enzima para cada 50 mL de volume, por 4 horas a 55°C; <sup>2</sup>Ensaio 2: adição de 40 µL de enzima para cada 50 mL de volume, por 4 horas a 55°C; <sup>3</sup>Ensaio 3: adição de 20 µL de enzima para cada 50 mL de volume, por 3 horas a 55°C; <sup>4</sup>Ensaio 4: adição de 40 µL de enzima para cada 50 mL de volume por 3 horas a 55°C; <sup>5</sup>Ensaio 5: adição de 20 µL de enzima para cada 50 mL de volume por 8 horas a 55°C; <sup>6</sup>Ensaio 6: adição de 40 µL de enzima para cada 50 mL de volume por 8 horas a 55°C. Letras minúsculas indicam diferença estatística entre os testes pelo teste de Tukey (p<0,05).

No presente estudo, os valores do grau de hidrólise com o uso de alcalase variaram de 4,30±0,15% a 8,38±0,08%, estando abaixo dos encontrados para a hidrólise proteica de outros produtos já estudados anteriormente como coxa de frango (GH: 18,62 a 38,79%), peito de frango (GH: 20,93% a 57,42%) (Schmidt & Salas-Mellado, 2009) e corvina (GH: 12,2 ±0,11 a 43,7 ±0,33%) (Centenaro et al. 2009).

Apesar dessa diferença, o estudo de obtenção de peptídeos bioativos a partir de insetos é bastante recente (Pino et al. 2020), com isso mais pesquisas são necessárias para compreender a biologia do tenébrio e assim explorar e otimizar, de forma eficiente, a liberação dos peptídeos.

Alguns pesquisadores vêm investindo na combinação de métodos físico-enzimáticos para potencializar o grau de hidrólise durante a obtenção de peptídeos. Fathi et al. (2021) avaliaram a combinação de ultrassom+alcalase para a hidrólise do farelo de arroz. Nesse estudo, os resultados encontrados demonstraram que todas as amostras tratadas previamente com ultrassom apresentaram significativo aumento na hidrólise enzimática, chegando a valores de 27,35%, ao passo que para o controle (amostras sem tratamento com ultrassom) o valor de GH foi de 17,04%. Esse efeito benéfico do ultrassom sobre o GH é atribuído a desintegração de ligações proteicas entre as moléculas, aumentando posteriormente o encontro efetivo da enzima com o substrato. Rivero-Pino et al. (2020) sugerem que o tratamento prévio com ultrassom é capaz de modificar a estrutura nativa de proteínas, ou seja, clivar algumas interações entre aminoácidos e conseqüentemente expõe os resíduos hidrofóbicos de proteínas, resultando em um efeito positivo na liberação de diversos peptídeos bioativos. No mesmo estudo, os autores também observaram aumento no GH (30%) da proteína de *T. molitor* tratado previamente com sonicação, porém empregando tratamento enzimático sequencial com subtilisina e tripsina como catalisadores, diferentemente do nosso estudo, no qual empregamos a enzima alcalase.

A hidrólise proteica, pode ser realizada de diferentes formas, através do uso de ácidos, álcalis ou enzimas, porém esse último vem sendo o mais indicado. A hidrólise enzimática promove diversas vantagens como: a modificação das propriedades funcionais, físico-químicas e sensoriais das proteínas originárias, além de permitir maior controle da hidrólise e benefícios das propriedades do produto obtido (Schmidt;

Salas-Mellado, 2009). Segundo Fennema et al. (2019), as propriedades funcionais dos hidrolisados proteicos dependem do tipo de enzima usada na sua produção. Nesse sentido, a alcalase derivada do *Bacillus licheniformis* é a principal enzima comercial utilizada e recomendada na produção de hidrolisados proteicos, em função da sua especificidade inespecífica e eficiência (Schmidt & Salas-Mellado, 2009). Em estudo realizado por Tang et al. (2018), em que foi avaliada a hidrólise enzimática da proteína de *T. molitor* com diferentes enzimas (alcalase e flavourzyme) e combinações enzimáticas, os autores obtiveram o maior rendimento de hidrólise da proteína utilizando a alcalase, variando de 10,0% a 38,7%.

A partir disso, sugere-se que mais estudos sejam realizados a fim de testar a combinação de diferentes métodos físico-enzimáticos com o intuito de potencializar o grau de hidrólise da proteína do *T. molitor*.

### **3.4 Capacidade antioxidante dos peptídeos bioativos**

Os valores da capacidade antioxidante total dos peptídeos bioativos medida pelo método de redução do ferro férrico a ferro ferroso - FRAP são apresentados na Tabela 3. Os peptídeos bioativos obtidos nos ensaios 1, 3 e 4 apresentam significativamente maior potencial antioxidante comparados aos peptídeos obtidos nos ensaios 2, 5 e 6. Em estudo realizado por Wu et al. (2003), os hidrolisados que apresentaram maior atividade antioxidante foram aqueles obtidos com maior duração da hidrólise. Os autores consideram que quanto mais tempo de contato da enzima com o substrato, maior será a capacidade antioxidante, o que contraria os achados do nosso estudo. Na pesquisa realizada por Tang et al. (2018) também foram observadas elevada capacidade antioxidante de peptídeos bioativos obtidos a partir de *T. molitor* com o emprego de alcalase.

Várias metodologias têm sido desenvolvidas e aplicadas com o objetivo de avaliar a capacidade antioxidante dos mais diversos ingredientes. Em função dessa diversidade de técnicas e a ausência de um método universal capaz de medir a capacidade antioxidante, torna-se difícil fazer comparações numéricas entre os resultados obtidos por outros estudos (Morais et al., 2013). No entanto, quando comparado com frutos do cerrado, os resultados foram superiores a semente *Solanum lycocarpum* ( $167,11 \pm 0,219$ ), polpa *Byrsonima verbascifolia* ( $148,42 \pm 0,047$ ), Pedúnculo *Ciporeceus minensis* ( $151,67 \pm 0,043$ ) (Morais et al. 2013). Sendo assim, independentemente dos valores encontrados nos diferentes ensaios, todos os hidrolisados obtidos no presente estudo demonstraram capacidade antioxidante e são potenciais fontes para inclusão na dieta de peixes com a função de exercer efetiva ação protetora contra os processos oxidativos que ocorrem no organismo do animal e atuando na prevenção de enfermidades. As moléculas antioxidantes têm a função de diminuir a taxa de oxidação, inibindo os radicais livres ou retirando os metais que danificam as células (Kabel, 2014). Conforme, Chi et al. (2014), os peptídeos com menor peso molecular médio, ou seja, aqueles que compreendem peptídeos mais curtos e ativos, servem como doadores de elétrons e reagem com os radicais livres, tornando-os substâncias mais estáveis que interrompem as reações em cadeia.

Tabela 3: Capacidade antioxidante total de peptídeos bioativos obtidos a partir de *Tenebrio molitor*

Amostra	Capacidade Antioxidante (FRAP) <sup>7</sup>
Teste 1 <sup>1</sup>	265,15±7,00 <sup>b</sup>
Teste 2 <sup>2</sup>	235,09±6,00 <sup>a</sup>
Teste 3 <sup>3</sup>	276,41±6,41 <sup>b</sup>
Teste 4 <sup>4</sup>	275,13±8,00 <sup>b</sup>
Teste 5 <sup>5</sup>	237,31±7,00 <sup>a</sup>
Teste 6 <sup>6</sup>	239,89±0,89 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Teste 1: adição de 20 µL de enzima para cada 50 mL de volume, por 4 horas a 55°C; <sup>2</sup>Teste 2: adição de 40 µL de enzima para cada 50 mL de volume, por 4 horas a 55°C; <sup>3</sup>Teste 3: adição de 20 µL de enzima para cada 50 mL de volume, por 3 horas a 55°C; <sup>4</sup>Teste 4: adição de 40 µL de enzima para cada 50 mL de volume por 3 horas a 55°C; <sup>5</sup>Teste 5: adição de 20 µL de enzima para cada 50 mL de volume por 8 horas a 55°C; <sup>6</sup>Teste 6: adição de 40 µL de enzima para cada 50 mL de volume por 8 horas a 55°C; <sup>7</sup> Resultados estão expressos em µmol Fe II/g amostra. Letras minúsculas indicam diferença estatística entre os testes pelo teste de Tukey (p<0,05).

### 3.5 Capacidade antimicrobiana dos peptídeos bioativos

Conforme as figuras 2 e 3 observa-se que os peptídeos bioativos não foram efetivos para impedir o crescimento dos diferentes microrganismos avaliados. Houve

crescimento bacteriano em todas as diluições testadas. Nossos resultados contrariam estudos que enfatizam a capacidade antimicrobiana de peptídeos de insetos (Azmiera et al., 2022) bem como tenébrio. Sugere-se que a ausência de propriedades antimicrobianas observadas no presente estudo esteja ligadas a ausência de purificação dos peptídeos, prejudicando dessa forma a definição de concentrações a serem empregadas.

Os peptídeos antimicrobianos nos insetos são produzidos principalmente nos corpos gordurosos, nos hemócitos e em outros tecidos após uma lesão ou infecção microbiana, e estes são secretados na hemolinfa ou tecidos para eliminar microorganismos invasores (Ueda et al., 2005). Com relação aos mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos, conforme Józeiak et al. (2016), as propriedades antimicrobianas dos peptídeos de insetos podem estar ligada ao fato de serem constituídos por pequenas proteínas catiônicas, as quais são capazes de se ligar e interagir com lipídeos da membrana celular, de microorganismos, carregados negativamente, incluindo fosfolipídios aniônicos e grupos fosfato de lipopolissacarídeos de bactérias Gram-negativas, bem como ácidos teicóico e lipoteicóico que compõem a camada de peptidoglicano de bactérias Gram-positivas, e com isso ocorre uma inativação das mesmas.

Em estudo conduzido por Chae et al. (2012) observou-se que a Tenecina, peptídeo antimicrobiano obtido e purificado a partir de *Tenebrio molitor*, apresentou atividade bactericida contra *Escherichia coli*, Gram-negativa, porém não foi efetiva em impedir o crescimento de *Bacillus subtilis*, Gram-positivo, ou o fungo *Candida albicans*. Conforme relatado em estudo feito por Azmiera et al. (2022) os componentes responsáveis pela indução da atividade antimicrobiana no *Tribolium castaneum*, inseto da mesma família do tenébrio, podem sofrer variações em função de vários

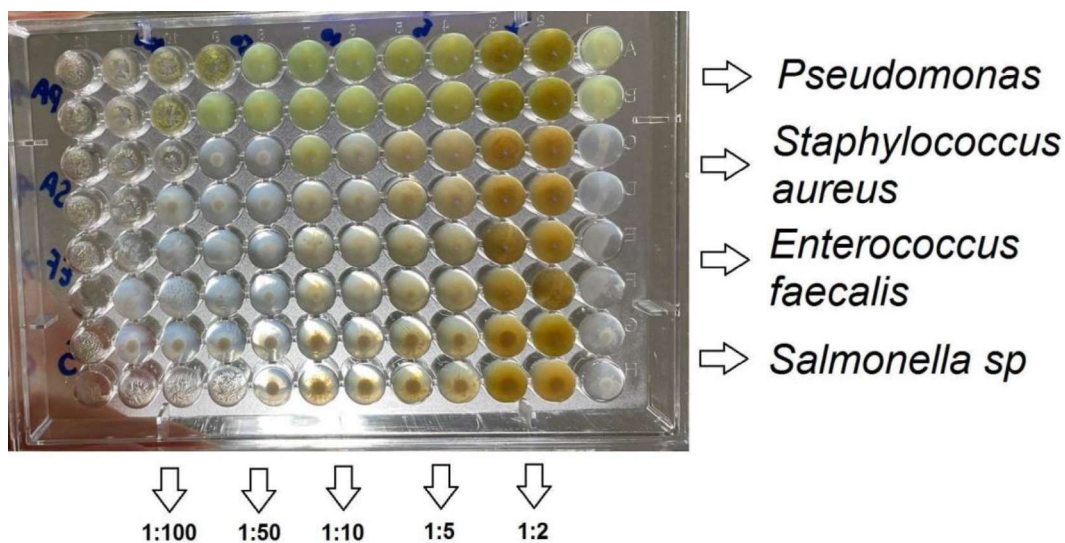


fatores como a idade, sexo e acasalamento, o que pode acabar interferindo nos mecanismos de ação dos antimicrobianos.

Os achados do presente estudo são de grande relevância, pois até o momento é encontrado somente um estudo (Chae et al., 2012) que se detém em avaliar a capacidade antimicrobiana de peptídeos obtidos a partir de tenébrio, conforme relatado em revisão feita por Azmiera et al. (2022).

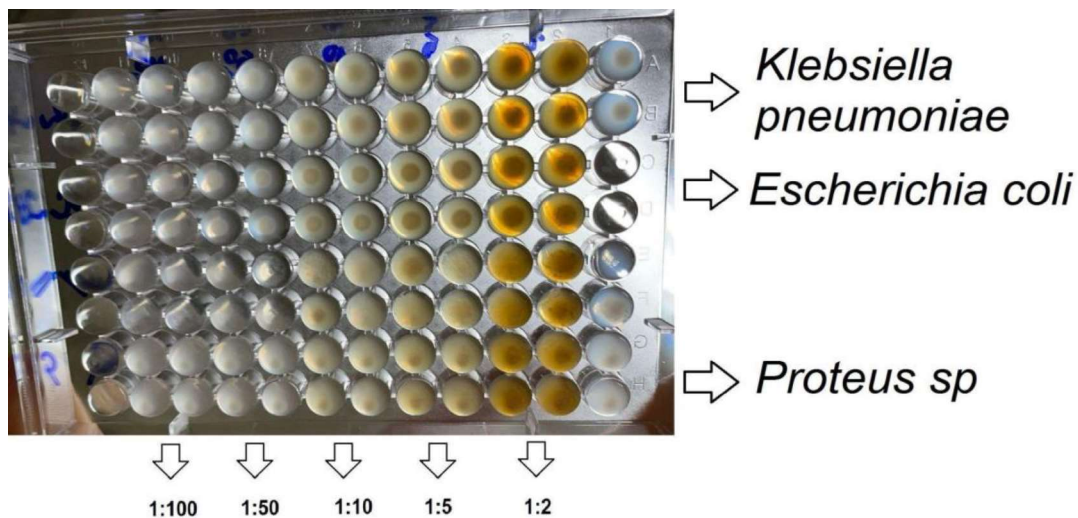
Apesar da ausência de efeitos inibitórios *in vitro* sobre microorganismos patogênicos, os peptídeos podem trazer efeitos positivos indiretos. A partir do momento que o animal recebe esse aditivo através da dieta, melhorias no sistema imunológico podem ocorrer, se refletindo em aumento na sua capacidade de enfrentar um patógeno.

Figura 3 Crescimento bacteriano *in vitro* de *Pseudomonas sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella sp.*



Fonte: Autoria própria

Figura 4 Crescimento bacteriano *in vitro* de *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Proteus sp*



Fonte: Autoria própria

#### 4 CONCLUSÃO

O processo de hidrólise aplicado na farinha de tenébrio desengordurada, utilizando alcalase, se mostrou efetivo em períodos mais longos de tratamento enzimático.

Os peptídeos demonstraram potencial bioativo através da elevada capacidade antioxidante observada para todos os tratamentos enzimáticos testados.

Além disso, esse trabalho é promissor pois traz resultados inovadores e que permitem dar continuidade em trabalhos futuros, pois a ausência de efeito antimicrobiano a partir dos peptídeos gerados merece maior aprofundamento de pesquisas a fim de elucidar níveis que sejam capazes de inativar microorganismos patogênicos e que permitam entender os mecanismos de ação dos peptídeos frente a patógenos.

## AGRADECIMENTOS

Agradecimento vai a FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul) pela bolsa 21/2551-00006056 concedida ao primeiro autor, e financiamento do projeto.

## REFERÊNCIAS

Alcarde, A. E.; Basso, L. C. 1997. Efeito da Trealose na manutenção da viabilidade de células de levedura desidratadas por liofilização.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC), Official Methods of Analysis of Official Analytical Chemists International, 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA, 1995.

Awad, E.; Awaad, A. 2017. Role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 67, 40-54.

Azmiera, N.; Krasilnikova, A.; Sahudin S.; Al-Talib H.; Heo C.C. 2022. Antimicrobial peptides isolated from insects and their potential applications. *Journal of Asia-Pacific Entomology*. 25 (22), p.22.

Bidinotto, P. M., Moraes, G., & Souza, R. H. S. (1997). Hepatic glycogen and glucose in eight tropical freshwater teleost fish: A procedure for field determinations of micro samples. *Boletim Técnico do CEPTA*, 10, 53-60.

Bligh, E.G., Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, v.37, 911–917.

Centenaro, G. S.; Prentice-Hernández, C.; Salas-Mellado, M. 2009. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA E DE SUBSTRATO NO GRAU DE HIDRÓLISE E NAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS DE HIDROLISADOS PROTEICOS DE CORVINA (*Micropogonias furnieri*). *Quimica Nova*. 32,(7) 1792-1798.

Chae, J. H.; Kurokawa, K.; So, Y. I.; Hwang, H. O.; Kim, M. S.; Park, J. W.; Jo, Y. H.; Lee Y. S.; Lee, B. L. (2012). Purification and characterization of tenecin 4, a new anti-

Gram-negative bacterial peptide, from the beetle *Tenebrio molitor*. *Developmental and Comparative Immunology*. 36(3), 540–546.

Chi, C.-F., Cao, Z.-H., Wang, B., Hu, F.-Y., Li, Z.-R., & Zhang, B. (2014). Propriedades Antioxidantes e Funcionais de Hidrolisados de Colágeno da Pele de

*Eleutheria*, E. C. A.; Araujo, P. A.; Panek, A. D. 1993. Role of the trehalose carrier in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. v.1156, 3, 21, p.263-266.

Esteban, M. A. 2012. An Overview of the Immunological Defenses in Fish Skin. *ISRN Immunology*. 1-29.

Fathi, P.; Moosavi-Nasab, M.; Mirzapour-Kouhdasht, A.; Khalesi, M. 2021. Generation of hydrolysates from rice bran proteins using a combined ultrasonication-Alcalase hydrolysis treatment. *Food Bioscience* 42.

Fennema, O. R.; Damodaran, S.; Parkin, K. L. 2019. Introdução à química de alimentos. In: Damodaran, S.; Parkin, K. L. (eds.) *Química de Alimentos de Fennema*. Artmed. 1-16pp.

Gibney, P. A., Schieler, A., Chen, J. C., Rabinowitz, J. D., & Botstein, D. (2015). Characterizing the in vivo role of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae* using the AGT1 transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(19), 6116–6121.

Goulart, F. R. Speroni, C. S. Lovatto, N. M. Loureiro, B. B. Corrêia V. Neto, J. R. Silva, L. P. 2013. Atividade de enzimas digestivas e parâmetros de crescimento de juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*) alimentados com farelo de linhaça *in natura* e demucilada. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v.34, n. 6. 3069-3080.

Hao, Y.T.; Guo, R.; Jia, G.W.; Zhang, Y.; Xia, H.; He L.X. 2020. Effects of enzymatic hydrolysates from poultry by-products (EHPB) as an alternative source of fish meal on growth performance, hepatic proteome and gut microbiota of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture Nutrition*, 00:1–13.

Halim, N.R.A.; Yusof, H.M.; Sarbon, N.M. 2016. Functional and bioactive properties of fish protein hydrolysates and peptides: A comprehensive review. *Trends in Food Science & Technology*, 51. 24e33.

Henry, M.; Gasco, L.; Piccolo, G.; Fountoulaki, E. 2015. Review on the use of insects in the diet of farmed fish: Past and future. *Animal Feed Science and Technology*, v.203, p. 1–22.

Hong, J., Han, T., & Kim, Y. Y. (2020). Mealworm (*Tenebrio molitor* Larvae) as an Alternative Protein Source for Monogastric Animal: A Review. *Animals*, 10(11), 20p.

Hoseinifar, S.H., Khalili, M., Rufchaei, R., Raeisi, M., Attar, M., Cordero, H., Esteban, M.A. 2015. Effects of date palm fruit extracts on skin mucosal immunity, immune related genes expression and growth performance of common carp (*Cyprinus carpio*) fry. *Fish and Shellfish Immunology*, v.47, p.706-711.

Jinsu Hong, J.; Han, T.; Yoo, Kim, Y.K. 2020. Mealworm (*Tenebrio molitor* Larvae) as an Alternative Protein Source for Monogastric Animal: A Review. *Animals*, 10.

Józeiak, D.; Józeiak, A.; Kierończyk, B.; Rawski, M.; Świątkiewicz, S.; Długosz, J.; 2016. Engberg, R. M. Insects – a natural nutrient source for poultry – a review. *Ann. Anim. Sci.* 16,(2) p.297–313.

KABEL, A. M. 2014. Free radicals and antioxidants: role of enzymes and nutrition. *World Journal of Nutrition and Health*. 2,(3), p.35-38.

Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000). Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 40(1), 43–81.

Lira, J. A. 2015. Avaliação da farinha de tenébrio (*Tenebrio molitor*) na alimentação de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*). Dissertação de Mestrado em Aquicultura. Universidade Nilton Lins, p. 53.

Liu, Y., Wan, S., Liu, J., Zou, Y., & Liao, S. 2016. Estudo de Atividade Antioxidante e Estabilidade de Peptídeos de Silkmoth Macho Hidrolisado Enzimaticamente. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(1): 13081.

Lopes, C. P.; Villela, G. G.; 1972. Trealose e Trealose em *Tenebrio molitor*. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Guanabara. 70(4), 574-583.

Lushchak, V. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, v.101, p.13-30.

Mohammadi, G.; Rafiee, G.; Basuini, M.F.E.; Abdel-Latif, H.M.R.; Dawood, M.A.O. 2020. The growth performance, antioxidant capacity, immunological responses, and the resistance against *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed Pistacia vera hulls derived polysaccharide. *Fish and Shellfish Immunology* 106, 36–43.

Morais, M.L.; Silva, A.C.R.; Araújo, C.R.R.A.; Esteves, E.A.; Villela, N.A.V.D.P. 2013. Determinação do potencial antioxidante in vitro de frutos do cerrado brasileiro. *Rev. Bras. Frutic.*, v. 35, n. 2, p. 355-360.

Moyses, C. C. Hirata W. T. 2021. Estudo das propriedades físico-químicas e funcionais da farinha da larva de inseto *Tenebrio molitor* e sua aplicação em produtos cárneos.

Trabalho de Conclusão de Curso. Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia.

Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R.L. 2001. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.49, p.4619-4626.

Pulido, R; Bravo, L; Saura-Calixto, F. 2000. Antioxidant activity of dietary as determined by a modified ferric. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, v.48, p.3396-3402.

Rivero-Pino, F. Espejo-Carpio, R. Pérez-Gálvez, A. Guadix, E. 2020. Effect of ultrasound pretreatment and sequential hydrolysis on the production of *Tenebrio molitor* antidiabetic peptides. *Food and Bioproducts Processing*, v. 123, p. 217-224.

Samaranayaka, A. G. P.; & Li-Chan, E. C. Y.; 2011. Antioxidantes Peptídicos Derivados de Alimentos: Uma Revisão de Sua Produção, Avaliação e Aplicações Potenciais. *Journal of Functional Foods*, 3, 229-254.

Salomón, R.; Firmino, J.P.; Reyes-López, F.E.; Andree, K.B. González-Silveira, D. Esteban, M.A.; Tort, L.; Quintela, J.C.; Pinilla-Rosas, J.M. Vallejos-Vidal, E. Gisbert, E. 2020. The growth promoting and immunomodulatory effects of a medicinal plant leaf extract obtained from *Salvia officinalis* and *Lippia citriodora* in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, v.524, 735291.

Schmidt, C. G.; Myriam Salas-Mellado, M. 2009. INFLUÊNCIA DA AÇÃO DAS ENZIMAS ALCALASE E FLAVOURZYME NO GRAU DE HIDRÓLISE DAS PROTEÍNAS DE CARNE DE FRANGO. *Quimica Nova*. 32,(5), 1144-1150.



Tang, Y., Debnath, T., Choi, E-J., Kim, Y.W., Ryu, J.P., Jang, S., Chung, S.U., Choi, Y-J., Kim, E-K. 2018. Changes in the amino acid profiles and free radical scavenging activities of *Tenebrio molitor* larvae following enzymatic hydrolysis. *Plos One*, v.13, n.5, e0196218.

Tubin, J. S. B. 2017. Farinha de insetos na alimentação de tilápias em sistema de bioflocos e recirculação de água. Dissertação de Mestrado em Zootecnia. Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC. p.97.

Ueda K.; Imamura M., Saito A., Sato R. (2005). Purification and cDNA cloning of an insect defensin from larvae of the longicorn beetle, *Acalolepta luxuriosa*. *Appl. Entomol. Zool.*, 40: 335–345.

Urbinati, E.C. Zanuzzo, F.S. Biller-Takahashi, J.D. 2014. Estresse e sistema imune em peixes. In: Baldisserotto, B.; Cyrino, J.E.P. Urbinati, E.C. *Biologia e Fisiologia de Peixes Neotropicais de Água Doce*. Jaboticabal: FUNEP, UNESP. 87-105.

Yousefi, S.; Shokri, M.M. Noveirian, H.A.; Hoseinifar, S.H. 2020. Effects of dietary yeast cell wall on biochemical indices, serum and skin mucus immune responses, oxidative status and resistance against *Aeromonas hydrophila* in juvenile Persian sturgeon (*Acipenser persicus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 106. 464–472.

Wu, H.-C., Chen, H.-M., & Shiau, C.-Y. 2003. Aminoácidos livres e peptídeos relacionados às propriedades antioxidantes em hidrolisados protéicos de cavala (*Scomber austriasicus*). *Food Research International*, 36(9-10), 949-957.

## **6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Esse trabalho tratou-se de um estudo inicial focado na obtenção de peptídeos bioativos com a finalidade de inclusão na dieta de peixes. Os resultados nos levam a concluir que se faz necessário a purificação e caracterização dos peptídeos, para compreender seus mecanismos de ação, e possibilitando estudos futuros para testar diferentes concentrações inibitórias.

A importância de estudos com *Tenébrio molitor*, tem grande relevância atualmente, pois este vem se destacando como fonte de proteína de baixo custo e alto valor nutricional, tanto na área da indústria aquícola como na nutrição humana.

## REFERÊNCIAS

AWAD, E.; AWAAD, A. Role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish. **Fish & Shellfish Immunology**, 67, p.40-54, 2017.

BARROSO, F. G.; DE HARO, C.; SÁNCHEZ-MUROS, M. J.; VENEGAS, E.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, A.; PÉREZ-BAÑÓN, C. The potential of various insect species for use as food for fish. **Aquaculture**, 422–423, p.193–201, 2014.

CABELLO, F. C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. **Environmental Microbiology**, 8(7), p.1137–1144, 2006.

Castro, T.; **Obtenção e análise da composição centesimal de farinha de larvas de Tenebrio molitor**. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia. p.29, 2021.

CARVALHO C., T., MASCOLI JUNIOR R., AMÉRICO-PINHEIRO J., H., P. O uso indiscriminado de antibióticos e os impactos nos ambientes aquáticos. 2016. **Anais do fórum ambiental da alta paulista - Sociedade, Meio Ambiente e Desenvolvimento**. Tupã/SP. v. XII. p.226-235, 2016.

CHEW, LY, TOH, GT E ISMAIL, A. (2019). Aplicação de Proteases para a Produção de Peptídeos Bioativos. **Enzimas em Biotecnologia Alimentar**, p.247-261, 2019.

CLEMENTE, A. Hidrolisados de proteínas enzimáticas na nutrição humana. **Trends in Food Science & Technology**, 11(7), p.254–262, 2000.

COUTO, M. V. S., DA COSTA SOUSA, N., PAIXÃO, P. E. G., DOS SANTOS MEDEIROS, E., ABE, H. A., MENESES, J. O., FUJIMOTO, R. Y. Is there antimicrobial property of coconut oil and lauric acid against fish pathogen? **Aquaculture**, 545, 737234, 2021.

DAI, C.; MA, H.; LUO, L. Peptídeo inibidor da enzima conversora de angiotensina I (ECA) derivado do hidrolisado de proteína de larva de Tenebrio molitor (L.). **European Food Research and Technology** 236, p.681-689, 2013.

DANIEL, N. A review on replacing fish meal in aqua feeds using plant protein sources. **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**. 6, p.164–179, 2018.

DE CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Peptídeos biologicamente ativos: Processos para sua geração, purificação e identificação e aplicações como aditivos naturais nas indústrias alimentícia e farmacêutica. **Food Research International**, 74, p.185-198, 2015.

DAMASCENO, C. S. B. OLIVEIRA, L. F. MIGUEL M. D. MIGUEL O. G. **Peptídeos Bioativos de Soja Glycine Max (L.) Merrill: uma Breve Revisão**. *Revista*

**Processos Químicos.** Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil. p.89-98, 2016.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. The state of world fisheries and aquaculture. **Sustainability in action**, 2020.

FARAG, M. R., ABDELNOUR, S. A., PATRA, A. K., DHAMA, K., DAWOOD, M. A. O., ELNESR, S. S., & ALAGAWANY, M. Propolis: Properties and composition, health benefits and applications in fish nutrition. **Fish & Shellfish Immunology**, 115, 179–188, 2021.

GASTALHO, S. DA SILVA G. J., RAMOS F. Uso de antibióticos em aquacultura e resistência bacteriana: Impacto em saúde pública. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v.3, n.1, p. 29-45, 2014.

GRAU, T.; VILCINSKAS, A.; JOOP G. Sustainable farming of the mealworm *Tenebrio molitor* for the production of food and feed. **Z. Naturforsch.** 72(9–10)c: 337–349, 2017.

GOULART F. R.; DALCIN M. O.; LOVATTO N. M.; BENDER A. B. B.; SILVA L. P.; PRETTO A. Caracterização e propriedades físico químicas de concentrados de fibras alimentares como potenciais ingredientes prebióticos para uso na nutrição de peixes. **Caderno de Ciências Agrárias**. v 12, p. 01-09, 2020.

HALIM, N. R. A.; YUSOF, H. M.; SARBON, N. M. Functional and bioactive properties of fish protein hydrolysates and peptides: A comprehensive review. **Trends in Food Science & Technology**, 51. 24-33, 2016.

HOSEINIFAR, S.H., KHALILI, M., RUFCHAEI, R., RAEISI, M., ATTAR, M., CORDERO, H., ESTEBAN, M.A. Effects of date palm fruit extracts on skin mucosal immunity, immune related genes expression and growth performance of common carp (*Cyprinus carpio*) fry. **Fish and Shellfish Immunology**, v.47, p.706-711, 2015.

ISHIKAWA, M.M; QUEIROZ J.F; NASCIMENTO J.L; PÁDUA S.B; MARTINS M.L. **Uso de biomarcadores em peixe e boas práticas de manejo sanitário para a piscicultura.** Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2020. 1º Edição. 28p.

KAČÁNIOVÁ, M., TERENTJEVA, M., VUKOVIC, N., PUCHALSKI, C., ROYCHOUDHURY, S., KUNOVÁ, S., IVANIŠOVÁ, E. A atividade antioxidante e antimicrobiana de óleos essenciais contra *Pseudomonas* spp. isolados de peixes. **Saudi Pharmaceutical Journal**, 25(8), p.1108–1116, 2017.

Liu, Y., Wan, S., Liu, J., Zou, Y., & Liao, S. 2016. Estudo de Atividade Antioxidante e Estabilidade de Peptídeos de Silkmoth Macho Hidrolisado Enzimaticamente. **Journal of Food Processing and Preservation**, 41(1): 13081.

MATOS, F. M.; Insetos comestíveis como potenciais fontes de proteínas para obtenção de peptídeos bioativos. **Brazilian Journal of Food Technology**. 24, 2021.

MILLER, RA, & HARBOTTLE, H. Resistência a drogas antimicrobianas em patógenos de peixes. **Microbiology Spectrum**, 6(1), 2018.

MINTAH, B. K.; HE, R.; DABBOUR, M.; GOLLY, M. K.; AGYEKUM, A. A.; MAS, H. Effect of sonication pretreatment parameters and their optimization on Theo antioxidant activity of *Hermitia illucens* larvae meal proteína hydrolysates. **Journal of Food Processing and Preservativo**. p.12, 2019.

MOHAMMADI, G.; RAFIEE, G.; BASUINI, M.F.E.; ABDEL-LATIF, H.M.R.; DAWOOD, M.A.O. The growth performance, antioxidant capacity, immunological responses, and the resistance against *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed Pistacia vera hulls derived polysaccharide. **Fish and Shellfish Immunology** 106, p.36–43, 2020.

NITBANIA, F. O.; SISWANTA, D.; SOLIKHAH, E. N. Isolation and Antibacterial Activity Test of Lauric Acid from Crude Coconut Oil (*Cocos nucifera* L.). **Procedia Chemistry**, 18, p.132–140, 2016.

NONGONIERMA, A. B., & FITZGERALD, R. J. Desbloqueando o potencial biológico de proteínas de insetos comestíveis por meio de hidrólise enzimática: uma revisão. **Ciência Alimentar Inovadora e Tecnologias Emergentes**, 43, p.239–252. 2017.

PEDROZA FILHO, M. X.; ROUTLEDGE, E. A. B. Intensificação produtiva da aquicultura brasileira e novas demandas tecnológicas. **Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA)**. 14p. 2017.

PEIXE BR - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA PISCICULTURA - **Anuário Peixe BR da Piscicultura, 2022**. Disponível em: <<https://www.peixebr.com.br/anuario2022/>>. Acesso em: 01/08/2022.

QUEIROZ, J. F. **Boas Práticas de Manejo (BPM) para a Aquicultura em Viveiros Escavados e em Reservatórios**. Embrapa, 2016.

RASHIDIAN, G.; MOGHADDAM, M. M.; MIRNEJAD, R.; AZAD, Z. M. Supplementation of zebrafish (*Danio rerio*) diet using a short antimicrobial peptide: Evaluation of growth performance, immunomodulatory function, antioxidant activity, and disease resistance. **Fish & Shellfish Immunology**. 119, p.42-50, 2021

RIBEIRO, R. C. P.; URBINATI, E. C. **Uso de selênio como modulador do estresse, sistema imune inato e antioxidante em juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887**. Dissertação de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP. Jaboticabal – São Paulo 2019.

SANTOS JUNIOR, J. R.T. **Farinha de *Tenebrio molitor* na alimentação de zebrafish (*Danio rerio*)**. 2018, Trabalho de Conclusão de Curso de Aquicultura, Universidade Federal do Pampa, 2018.

SARMADI, B. H.; ISMAIL, A. **Antioxidative peptides from food proteins: A review peptides**. 31(10), p.1949-1956, 2010.

SOUZA JÚNIOR, E. C. **Biocatalisadores produzidos pela imobilização de proteases em carvões ativados e sua aplicação na hidrólise de caseína para obtenção de peptídeos com propriedades antihipertensivas.** 2019. Tese Doutorado em Engenharia e Ciências de Alimentos, da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB.

SHAFIQUE, L., ABDEL-LATIF, H. M. R., HASSAN, F., ALAGAWANY, M., NAIEL, M. A. E., DAWOOD, M. A. O., YILMAZ, S., LIU, Q. The Feasibility of Using Yellow Mealworms (*Tenebrio molitor*): Towards a Sustainable Aquafeed Industry. **Animals**, 11(3), p.811, 2021

SÁNCHEZ-MUROS, M., DE HARO, C., SANZ, A., TRENZADO, C. E., VILLARECES, S., & BARROSO, F. G. Nutritional evaluation of *Tenebrio molitor* meal as fishmeal substitute for tilapia (*Oreochromis niloticus*) diet. **Aquaculture Nutrition**, 22(5), 943–955, 2015.

TANG, Y., DEBNATH, T., CHOI, E.-J., KIM, Y.W., RYU, J.P., JANG, S., CHUNG, S.U., CHOI, Y.-J., KIM, E.-K. Changes in the amino acid profiles and free radical scavenging activities of *Tenebrio molitor* larvae following enzymatic hydrolysis. **Plos One**, v.13, n.5, 2018.

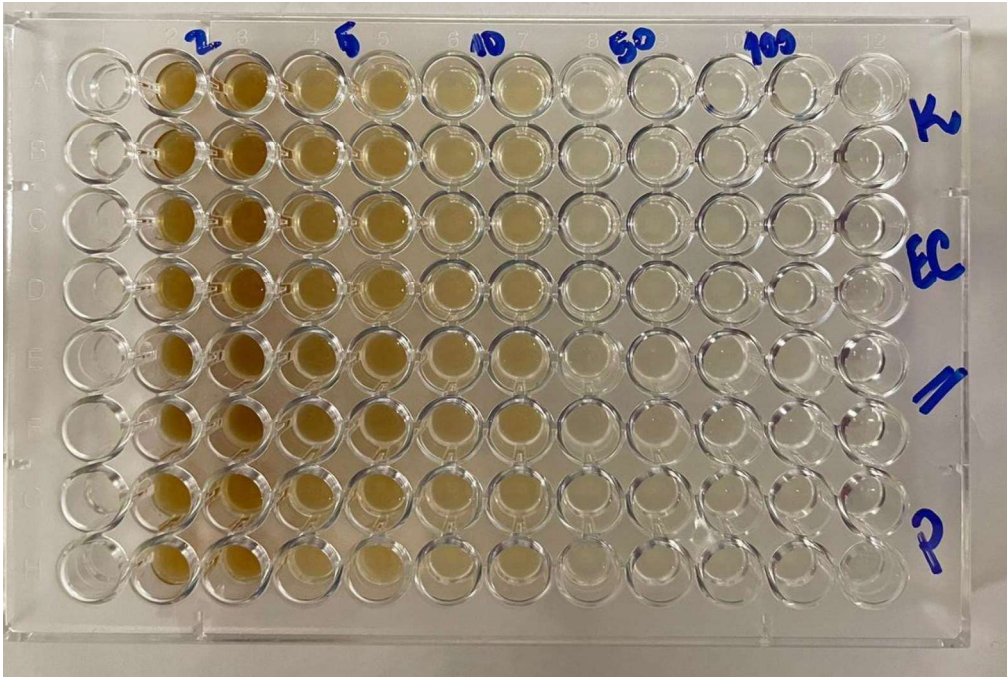
TONOLO, F., FOLDA, A., CESARO, L., SCALCON, V., MARIN, O., FERRO, S., RIGOBELLO, M. P. Milk-derived bioactive peptides exhibit antioxidant activity through the Keap1-Nrf2 signaling pathway. **Journal of Functional Foods**, 2019.

VANECCI-SILVA, D., ASSANE, IM, DE OLIVEIRA ALVES, L., GOMES, FC, MORO, EB, KOTZENT, S., PILARSKI, F. *Klebsiella pneumoniae* causando mortalidade em massa em juvenis de tilápia do Nilo no Brasil: Isolamento, caracterização, patogenicidade e relação filogenética com outras cepas ambientais e patogênicas de origem animal e humana. **Aquicultura**, 546, 2022.

VIEIRA, B. B. PEREIRA, E.L. Potencial dos Probióticos para o uso na Aquicultura. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 14, n. 2, p. 1223-1241, 2016.

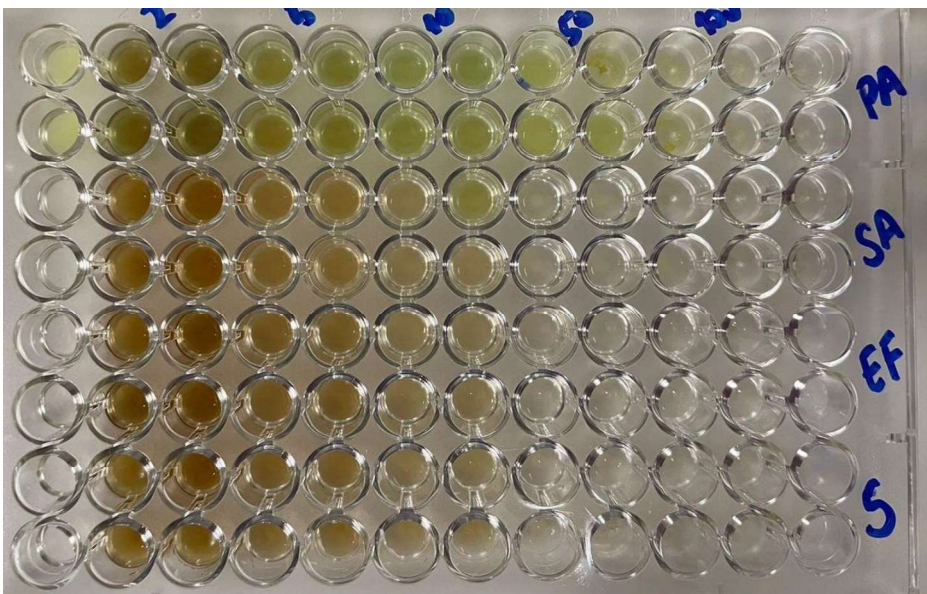
## APÊNDICES:

Figura 1 Avaliação antimicrobiana dos peptídeos bioativos contra *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Proteus sp.*



Fonte: Autoria própria

Figura 2 Avaliação antimicrobiana dos peptídeos bioativos contra *Pseudomonas sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella sp.*



Fonte: Autoria própria

Figura 3 Realização da análise antimicrobiana



Fonte: Autoria própria

Figura 4 Realização da análise de gordura



Fonte: Autoria própria



## ANEXOS

### **Normas de submissão para Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**

#### **Diretrizes para Autores**

O original deve ser submetido pelo sistema on-line, após cadastro no mesmo como AUTOR. Não serão aceitas submissões feitas por outros modos. O arquivo submetido NÃO deverá conter os nomes dos autores. A identificação e cadastro dos autores será feito unicamente através do sistema eletrônico de submissão.

**ATENÇÃO:** Todo manuscrito submetido deve ser acompanhado da sugestão de 5 possíveis revisores, incluindo nome, e-mail de contato e instituição. Estes contatos devem ser indicados no campo “Mensagem para o Editor” durante o processo de submissão.

Tipos de manuscritos A Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology – BJUST aceita manuscritos para serem publicados como Artigos, Revisões e Notas Breves.

*Artigos:* Relatam resultados de pesquisas originais, ainda não publicados em outras revistas. Devem estar organizados em uma sequência lógica, com as seguintes seções: Título, Título breve (até 50 caracteres e diferente do título), Título em inglês, Abstract (em inglês, até 300 palavras), Keywords (em inglês), Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões (opcional), Agradecimentos (opcional), Referências e Listagem de tabelas e figuras (com respectivas legendas). Manuscritos para Artigos não devem exceder 30 páginas incluindo tabelas e figuras.

*Notas Técnicas:* São relatos curtos de pesquisas ou observações originais acerca de uma temática afins. Devem conter Abstract (em inglês, até 300 palavras), Desenvolvimento do texto e Conclusão opcional. O desenvolvimento do texto deve ser de forma livre, com ou sem subtítulos. Quando houver, deverão ser diferentes da estrutura de Artigo. Manuscritos submetidos para Notas Técnicas não devem ter mais de 10 páginas incluindo tabelas e figuras.

*Revisões:* Tratam de assuntos de interesse geral da comunidade científica, ligados aos campos de ciência e tecnologia nos meios aquático e costeiro. Devem conter Abstract (em inglês, até 300 palavras), Desenvolvimento do texto e Conclusão

opcional. Revisões devem buscar resumir assuntos de um tópico e não apresentar grandes quantidades de informações detalhadas. A publicação de revisões depende de uma aceitação formal por parte dos editores. Não há limitação no tamanho dos manuscritos para Revisões.

## **Língua**

A BJAST aceita artigos em português e inglês. Todos os artigos em português deverão ter um Abstract em inglês. Após aprovação do manuscrito, o abstract passará por uma revisão pelo Núcleo de Línguas da Univali, de forma gratuita.

Recomenda-se fortemente a submissão de artigos em inglês para que tenha uma disseminação maior e conseqüentemente maior impacto na área. Artigos em inglês podem seguir o estilo e grafia “americano” ou o “britânico”. É responsabilidade do autor a qualidade do idioma. Ainda, caso o inglês não esteja na qualidade necessária, os avaliadores poderão solicitar uma revisão profissional certificada.

## **Formato**

Todos os manuscritos, independente da seção ao qual se destinam, deverão ser encaminhados em formato OpenOffice (.ODT), Microsoft Word (.DOC) ou Rich Text Format (.RTF).

O texto deverá ser digitado com tamanho de folha A4, margens superior e inferior de 2,5 cm e esquerdo e direito de 3,0 cm, espaço duplo, letra arial 12, linhas numeradas, e todas as páginas numeradas. Todas os cabeçalhos das seções (Introdução, Materiais e Métodos, etc.) deverão estar em negrito (e.g. Introdução). Se forem utilizados cabeçalhos para níveis inferiores, estes deverão ser colocados em itálico (e.g. Área de Estudo).

Abreviações de origem latina ('e.g.', 'et al.') não devem estar em itálico. As expressões 'e.g.' e 'i.e.' não devem ser seguidas de vírgula. Nomes de espécies devem ser dados por extenso na primeira vez que forem mencionados, incluindo o nome do descritor (e.g. 'Crassostrea gasar (Adanson, 1757)'). Posteriormente o nome completo pode ser utilizado ou não à critério dos autores. Em todas as ocasiões deverão ser escritos em itálico.

*Números, datas e referências a mapas:* Os numerais quando utilizados isoladamente devem grafados por extenso até dez. De 11 até 999, usam-se os algarismos arábicos. A partir do milhar (mil), são grafados de forma mista (e.g. 150 mil, 15 milhões, dois

bilhões). Para unidades muito elevadas sugere-se totalmente por extenso. Quando expressam dados estatísticos e matemáticos, medições específicas e de caráter preciso expressas em unidades de padrão internacional e porcentagens, deverão ser grafados em algarismos arábicos quando estiverem acompanhados do respectivo símbolo de medida (e.g. 3%, 5°C). As frases não devem ser iniciadas com algarismos, mas com o número por extenso. Não devem ser utilizados espaços ou pontos para separar milhares (e.g. 123654). Valores decimais devem utilizar vírgulas (e.g. 1789,25). Devem ser utilizadas as unidades do Sistema Internacional de Unidades (SI). Para definição das unidades conferir em <http://www1.bipm.org/en/si/> Devido à tradição na área náutica, são aceitas excepcionalmente as unidades 'nó' e 'milha náutica'. As unidades devem seguir os algarismos sem espaços (e.g. 12cm; 1,35km). Datas devem ser expressa no formato DD/MM/AAAA (e.g. 19/05/1970) ou '19 de maio de 1970'. Quando se referir a décadas, evitar usar apenas a dezena, por poder confundir quanto ao século de referência (e.g. "década de 1990" ou "década de 90 do século XX"). Coordenadas geográficas devem ser no formato 26°54'S, 48°39'W ou 26°54'28"S, 48°39'43"W.

*Tabelas e Figuras:* Devem estar em tamanho adequado para avaliar sua relevância para o artigo e qualidade do material apresentado. Para a versão final do manuscrito, após as devidas correções, as figuras deverão ser enviadas separadamente pelos autores. Cada figura deverá ser submetida em um arquivo de imagem separado, utilizando a opção "Material Suplementar".

Gráficos e ilustrações geradas por computador devem ser enviadas preferencialmente em formato vetorial tais como Scalable Vector Graphics (.SVG) e Windows Meta File (.WMF). Fotos e imagens escaneadas devem ser enviadas preferencialmente no formato TIFF, em resolução igual ou maior do que 600 dpi. Para informações sobre como preparar figuras para uma publicação, consulte o guia disponível na Public Library of Science - Guidelines for Figure and Table Preparation

## **Citações e Referências**

### *Citações no texto*

Um autor: Andrade (2001); (Andrade, 2001);

Dois autores: Andrade & Perez (2001); (Andrade & Perez, 2001)

Três ou mais autores: Andrade et al. (2001) e (Andrade et al., 2001).

No caso da citação de mais de uma referência deve-se seguir a ordem cronológica das mesmas: "Barreto & Resgalla (1995), Andrade et al. (2001)" ou "(Barreto & Resgalla, 1995; Andrade et al., 2001)"

### *Referências*

Listar somente as citações do texto em ordem alfabética, segundo o modelo abaixo:

#### *Artigo:*

Pereira Filho, J.; Rorig, L.R.; Hesse, K.; Schettini, C.A.F.; Proença, A.L. & Santos, J.E. 2009. Primary and bacterial production processes in the lower Itajaí-Açú estuary, Santa Catarina, Brazil. Braz. J. Aq. Sci. and Tech. 13(1): 1-10.

#### *Livro:*

Parsons, T.R.; Takahashi, M. & Hargrave, B. 1984. Biological oceanographic process. 3° Edição. Pergamon Press, Oxford, 330p.

#### *Capítulo de livro:*

Smaal, A.C. & Widdows, J. 1994. The scope for growth of bivalves as an integrated response parameter in biological monitoring. In: Kramer, K.J.M. (ed.) Biomonitoring of coastal waters and estuaries. CRC Boca Raton. 247-267pp.

#### *Teses:*

Godoi, S.S. 1982. Estudos das variações sazonais da frente oceânica entre a Corrente do Brasil e a Corrente das Malvinas, utilizando dados oceanográficos e dados do satélite SMS-2. Tese de Mestrado. Instituto de Pesquisas Espaciais - INPE. 123p.

A revista BJASt não aceita como referências resumos e resumos expandidos de encontros científicos. Relatórios técnicos de circulação restrita, bem como textos de sites da internet devem ser evitados, e seu uso deverá ser justificado à Comissão Editorial.

### **Notas Técnicas**

São relatos curtos de pesquisas ou observações originais. Devem conter Resumo, Introdução e Conclusão opcional. O desenvolvimento do texto deve ser de forma livre, com ou sem subtítulos. Quando houver, deverão ser diferentes da estrutura de Artigo. Manuscritos submetidos para Notas Técnicas não devem ter mais de 10 páginas incluindo tabelas e figuras.

### **Declaração de Direito Autoral**

Autores que publicam nesta revista concordam com os seguintes termos:

Os Autores mantêm os direitos autorais e concedem à revista o direito de primeira publicação, com o trabalho simultaneamente licenciado sob a Creative Commons Attribution License que permite o compartilhamento do trabalho com reconhecimento da autoria do trabalho e publicação inicial nesta revista.

Autores têm autorização para assumir contratos adicionais separadamente, para distribuição não-exclusiva da versão do trabalho publicada nesta revista (ex.: publicar em repositório institucional ou como capítulo de livro), com reconhecimento de autoria e publicação inicial nesta revista.

Autores têm permissão e são estimulados a publicar e distribuir seu trabalho online (ex.: em repositórios institucionais ou na sua página pessoal) a qualquer ponto antes ou durante o processo editorial, já que isso pode gerar alterações produtivas, bem como aumentar o impacto e a citação do trabalho publicado.

### **Política de Privacidade**

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.