# PRODUÇÃO INTEGRADA DE PROTEASES E PEPTÍDEOS BIOATIVOS POR MEIO DE FERMENTAÇÃO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS DE LARVAS DA MOSCA SOLDADO-NEGRA (*HERMETIA ILLUCENS*)

**Palavras-Chave: PROTEÍNAS DE INSETOS; PROTEASES; HIDROLISADOS PROTEICOS**

**Autores(as):**
**Cecília Candido Rodrigues de Souza, FEA – UNICAMP, Yuri Matheus Silva Amaral, FEA – UNICAMP,**
**Prof. Dr. Ruann Janser Soares de Castro (orientador), FEA – UNICAMP**

## INTRODUÇÃO

Até 2050, a demanda global por alimentos deve crescer 50%, com aumento de 70% na demanda por proteínas animais (AGUILAR-TOALÁ et al., 2025). Neste cenário, os insetos comestíveis se apresentam como uma fonte proteica alternativa mais sustentável quando comparado às proteínas tradicionais de origem animal (PASTRANA-PASTRANA et al., 2025).

Dentre os principais insetos indicados como comestíveis, destaca-se a larva da mosca soldado-negra, uma das espécies mais produzidas comercialmente devido à sua alta produtividade**,** rápido ciclo de reprodução**,** alta densidade populacional e composição nutricional que atinge até 50% de proteína na matéria seca (MOUITHYS-MICKALAD et al., 2020). Todavia, a entomofagia, prática do consumo de insetos, se mostra mais efetiva e com maior aceitação em sociedades ocidentais se incorporada em alimentos familiares ou se processada a uma forma totalmente dissociada do inseto (PASTRANA-PASTRANA et al., 2025; HARTMANN et al., 2015).

Processos biotecnológicos como a hidrólise enzimática e a fermentação são processos efetivos em transformar as propriedades funcionais de proteínas, como na geração de peptídeos bioativos com atividades antioxidantes, anti-hipertensivas, antimicrobiana e anticoagulantes (MUÑOZ-SEIJAS et al., 2024; CASTRO e SATO, 2015) Esses processos podem ser utilizados de forma economicamente circular para produzir biomoléculas de alto-valor agregado e modificar as proteínas de inseto para alcançar características funcionais e tecnológicas desejáveis.

## METODOLOGIA

A farinha desengordurada de larvas da mosca soldado-negra foi fornecida pela empresa Agrin Criação e Comércio de Insetos (Avaré, São Paulo). A cepa de *Aspergillus tubingensis* LBA02, utilizada nos processos fermentativos, pertence à coleção de culturas do Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP. O processo fermentativo foi conduzido com 20 g de substrato, composto por farinha de larvas da mosca solda-negra e farelo de trigo (12,5% m/m) com 45% de umidade, durante 72 h e à 30 ºC. A concentração de esporos inoculados foi de $5{,}05.10^6$ esporos/g. A solução isenta de qualquer material sólido, obtida pela adição de 50 mL de água destilada seguida de maceração, manutenção em repouso por 1 h e filtração utilizando gaze, foi utilizada como extrato bruto. O material insolúvel (biomassa fermentada) foi recuperado, esterilizado a 121°C por 15 min, e utilizado como substrato na hidrólise enzimática das proteínas.

As proteases foram concentradas pela adição de sulfato de amônio sólido $(NH_4)_2SO_2$ (80%), seguida por diálise e liofilização (extrato semipurificado). O processo de concentração de proteases foi avaliado a partir da quantificação da atividade proteolítica específica dos extratos bruto e semipurificado, do rendimento de proteínas recuperadas no processo, e determinação do fator de purificação. As proteases foram caracterizadas quanto ao efeito do pH e temperatura na atividade e estabilidade enzimática, bem como pela determinação da cinética enzimática.

A hidrólise enzimática foi realizada a partir de amostras de 50 mL das dispersões de proteínas (100 mg $mL^{-1}$) em tampão pH 2,0, adicionadas das proteases (50 U $mL^{-1}$) e incubadas a 50 °C sob agitação de 100 rpm durante um máximo de 120 min, com coleta de amostras a cada 30 min. As propriedades antioxidantes foram realizadas por meio dos seguintes métodos: ABTS (RASERA et al., 2019), DPPH (RASERA et al., 2019) e FRAP (SANTOS; DACCACHE; DE CASTRO, 2022). O grau de hidrólise foi determinado pela reação TNBS conforme descrito por Sousa, Borges e Pintado (2020) com modificações. A atividade antidiabética foi avaliada por meio da inibição das enzimas α-amilase e α-glicosidase, enquanto a atividade anti-hipertensiva foi determinada pela inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) (MATOS et al., 2022).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para a atividade específica de proteases dos extratos bruto e semipurificado, o rendimento e o fator de purificação estão dispostos na Tabela 1. Após o processo de concentração, houve um aumento de 31,5% na atividade específica das proteases em comparação ao extrato bruto, com um rendimento de 28% de proteínas recuperadas no processo, enquanto o fator de purificação foi de 1,31. De acordo com Amaral et al. (2020), esse fator de purificação pode ser considerado como uma pré-purificação das proteases, resultado da remoção de proteínas sem atividade proteolítica.

**Tabela 1.** Atividade específica, rendimento e fator de purificação da protease de *A. tubingensis* concentrada a partir do extrato bruto obtido da fermentação semissólida da farinha de proteínas de larvas da mosca soldado-negra.

| **Atividade específica (U/g)** | | **Parâmetros de Purificação** | |
|---|---|---|---|
| **Extrato bruto** | 5481,48 | **Rendimento (%)** | 28 |
| **Extrato semipurificado** | 7207,84 | **Fator de Purificação** | 1,31 |

O perfil de atividade enzimática em diferentes valores de temperatura e pH estão exibidos nas Figuras 1A e 1B.. As proteases extraídas apresentaram temperatura ótima entre 50 e 60 ºC e pH ótimo em uma faixa entre 2 e 4, podendo ser classificada como proteases ácidas. Além disso, a energia de ativação foi determinada e o valor encontrado foi de 20,12 kJ/mol. Castro et al., (2015) reportaram resultados similares para a protease obtida a partir da fermentação semissólida de farinha de soja por *Aspergillus niger* LBA02, que apresentou energia de ativação de 19,44 kJ/mol no intervalo de 35 a 50 °C.

Em relação ao efeito do pH e da temperatura na estabilidade enzimática, o comportamento está descrito na Figura 3A e B. Em relação à temperatura, somente a partir de 45 ºC (Figura 3A), a enzima apresentou decaimento progressivo da atividade, indicando desnaturação enzimática. Enquanto para o pH, a enzima apresentou alta estabilidade no intervalo e tempo avaliados (Figura 3B).

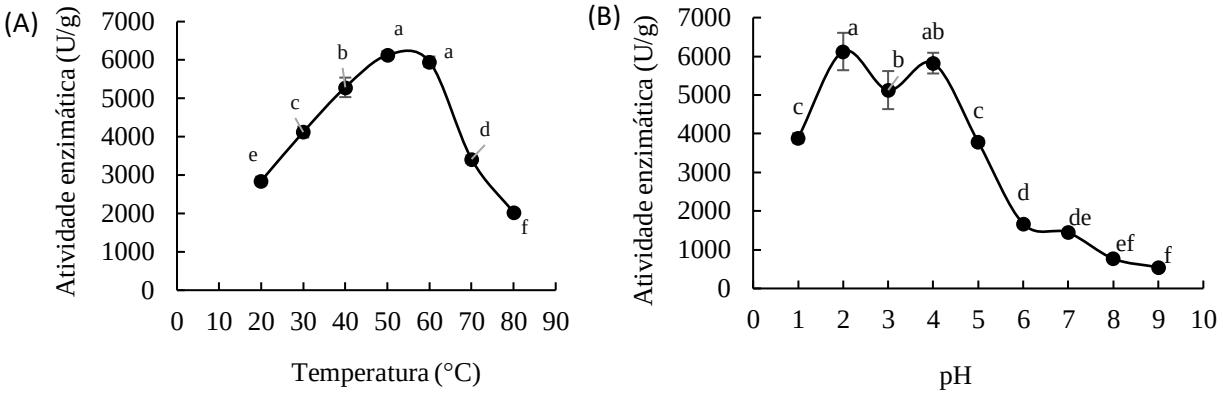


**Figura 1.** Efeito da temperatura (A) e do pH (B) na atividade de protease de *A. tubingensis* concentrada a partir da fermentação semissólida da farinha de proteínas de larvas da mosca soldado-negra. Letras diferentes na mesma curva indicam diferença estatisticamente significativa ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey.

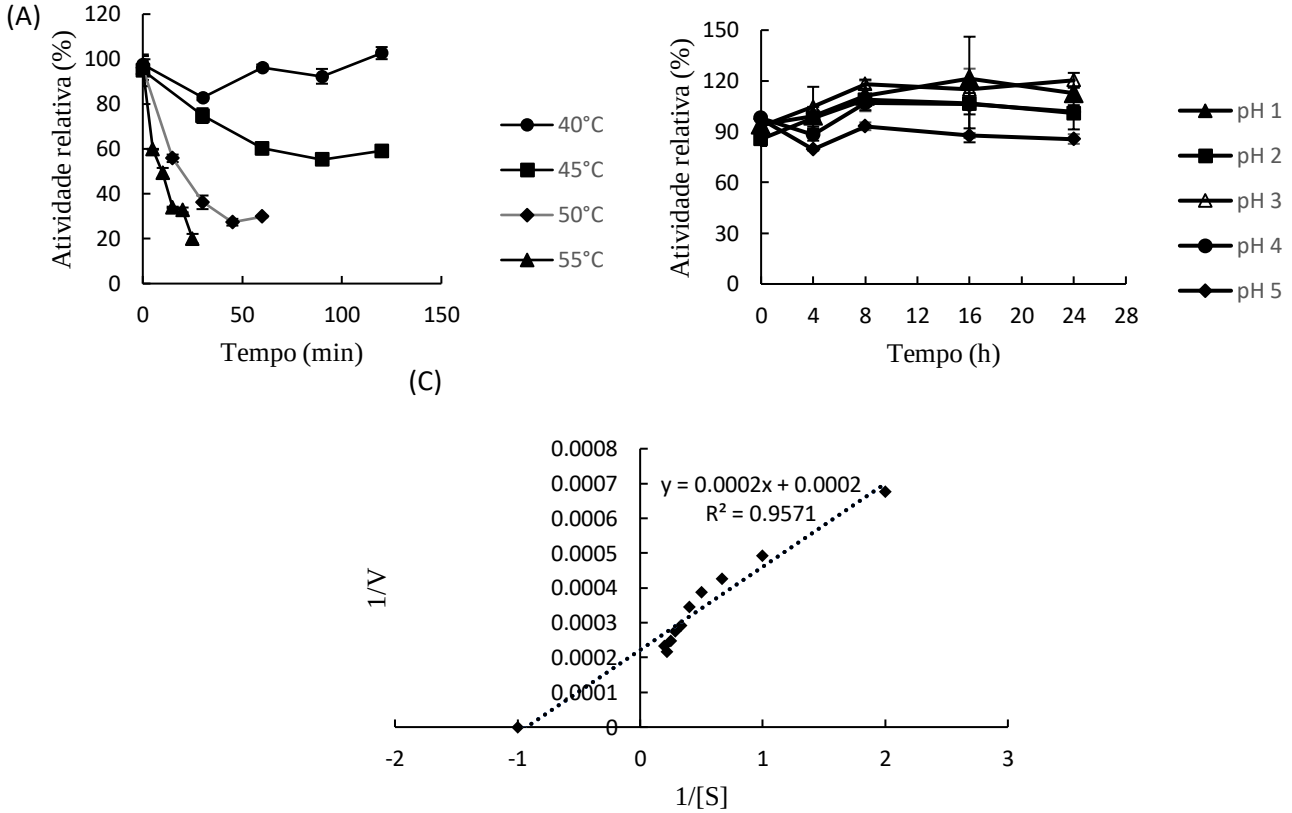


**Figura 3.** Efeito da temperatura (A) e do pH (B) na estabilidade enzimática e curva de Lineweaver–Burk (C) da protease de *A. tubingensis* concentrada a partir da fermentação semissólida da farinha de proteínas de larvas da mosca soldado-negra.

Seguindo a curva de Lineweaver–Burk ($0{,}95 \leq R^2 \leq 0{,}96$), como ilustra a Figura 3C foram obtidos os valores de $K_m$ e $V_{max}$ das proteases, sendo, respectivamente, 1,00 mg/mL e 5000 U/g. O valor baixo de $K_m$ indica alta afinidade da enzima com o substrato de azocaseína, enquanto o parâmetro $V_{max}$ determina a velocidade máxima da enzima em reação (CASTRO et al., 2015).

Em relação à hidrolise enzimática da biomassa fúngica de *A. tubingensis* resultante do processo fermentativo, os resultados para a atividade antioxidante mensurados pelos métodos de ABTS, DPPH e FRAP, grau de hidrólise e inibição das enzimas α-amilase, α-glicosidase e ECA para a cinética de hidrólise estão dispostos na Tabela 2. O método FRAP apresentou maior atividade antioxidante no tempo 0 min, com um valor de 136,14 µmol TE/g. Para ABTS, o maior valor (763,30 µmol TE/g) foi alcançado em 120 min, enquanto para DPPH, os tempos de 15 e 120 minutos apresentaram os maiores valores de atividade antioxidante: 70,19 e 69,68 µmol TE/g, respectivamente.

**Tabela 2.** Cinética de hidrólise da biomassa da fermentação semissólida da farinha de larva da mosca soldado-negra e resultados obtidos para atividade antioxidante mensurada pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP, grau de hidrólise e inibição de α-amilase, α-glicosidase e ECA.

| Tempo (min) | FRAP (µmol TE/g) | Variação* (%) | ABTS (µmol TE/g) | Variação* (%) | DPPH (µmol TE/g) | Variação* (%) | Grau de hidrólise (%) | Variação da atividade enzimática (%) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | | α-amilase | α-glicosidase | ECA |
| 0 | 136,14 ± 6,85$^{a}$ | - | 548,23 ± 7,63$^{d}$ | - | 61,01 ± 3,74$^{b}$ | - | 22,75 ± 1,54$^{d}$ | 30,30 ± 0,54$^{a}$ | 98,89 ± 2,04$^{ab}$ | -47,15 ± 2,85$^{a}$ |
| 15 | 127,42 ± 1,13$^{ab}$ | -6,40 | 655,48 ± 26,88$^{c}$ | 19,56 | 70,19 ± 2,07$^{a}$ | 15,04 | 40,07 ± 1,11$^{c}$ | 16,63 ± 0,28$^{e}$ | 70,26 ± 7,05$^{de}$ | -75,04 ± 5,02$^{b}$ |
| 30 | 121,75 ± 2,18$^{bc}$ | -10,56 | 674,56 ± 11,58$^{bc}$ | 23,04 | 69,04 ± 4,85$^{ab}$ | 13,16 | 42,19 ± 0,75$^{c}$ | 24,60 ± 0,33$^{b}$ | 104,91 ± 1,42$^{a}$ | -69,17 ±1,67$^{b}$ |
| 60 | 117,00 ± 4,80$^{c}$ | -14,06 | 702,05 ± 3,26$^{b}$ | 28,06 | 66,84 ± 2,25$^{ab}$ | 9,55 | 48,22 ± 0,96$^{b}$ | 23,07 ± 0,22$^{c}$ | 83,32 ± 1,96$^{cd}$ | -45,18 ± 3,72$^{a}$ |
| 90 | 124,17 ± 4,92$^{bc}$ | -8,79 | 695,69 ± 27,23$^{bc}$ | 26,89 | 64,59 ± 1,34$^{ab}$ | 5,86 | 48,58 ± 0,91$^{b}$ | 19,58 ± 0,29$^{d}$ | 57,32 ± 8,48$^{e}$ | -50,91 ± 1,66$^{a}$ |
| 120 | 126,90 ± 2,80$^{ab}$ | -6,78 | 763,30 ± 15,10$^{a}$ | 39,23 | 69,68 ± 1,65$^{a}$ | 14,21 | 55,31 ± 0,44$^{a}$ | 19,58 ± 0,10$^{d}$ | 88,44 ± 6,77$^{bc}$ | -52,80 ± 2,70$^{a}$ |

*Variação da atividade antioxidante em relação ao ensaio não hidrolisado (tempo 0). Os resultados são apresentados como a média (n = 3) ± desvio padrão e, quando seguidos por letras diferentes na mesma coluna, indicam a diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey. 1 A unidade µmol TE $g^{-1}$ corresponde a µmol de Trolox Equivalentes por grama de proteína.

Devido ao alto teor de proteínas do substrato e a alta produção de proteases, durante a fermentação semissólida, peptídeos bioativos e metabólitos secundários com atividade antioxidante podem ser produzidos, o que pode justificar os altos valores de atividade antioxidante no tempo zero da cinética de hidrólise (AMARAL e CASTRO, 2023). No entanto, o grau de hidrólise apresentou crescimento progressivo até 120 min, alcançando a valor máximo de 55,31% e, embora peptídeos de baixo peso molecular tendam a possuir atividade antioxidante superior, a composição desse peptídeo é o que realmente é responsável sua ação bioativa, através da ação conjunta entre: 1) exposição dos grupos do aminoácido para interações com radicais livres, 2) presença de grupos hidrofóbicos e 3) presença de grupos que doam elétrons ou íons H+ (MATOS, RASERA, CASTRO, 2024). Todavia, é importante notar que o alto grau de hidrólise demonstra a eficiência do processo de hidrólise, que se torna uma ferramenta promissora na recuperação da proteína insolúvel presente na biomassa, reforçando o impacto da economia circular no reaproveitamento de resíduos.

Os hidrolisados proteicos apresentaram atividade anti-hipertensiva ao longo da cinética, com inibição máxima da ECA (75,04%) em 15 minutos, efeito biológico atribuído à capacidade de sequências específicas de aminoácidos em inibir a ação da ECA (MATOS, RASERA, CASTRO, 2024). O declínio da atividade em tempos prolongados pode ser explicado pela degradação dos peptídeos bioativos devido à hidrólise excessiva (AGYEI et al., 2016).

Durante a cinética de hidrólise, não foi detectada a capacidade de inibição das enzimas α-amilase e α-glicosidase, demonstrando que os hidrolisados obtidos não apresentaram potencial antidiabético. Peptídeos bioativos possuem a capacidade de interagir eletrostaticamente com as enzimas α-amilase e α-glicosidase, e modificar a conformação enzimática. Desse modo, a interação enzima-substrato pode ser facilitada ou dificultada e a energia de ativação da reação diminuída ou aumentada, respectivamente, acarretando um aumento ou redução de atividade enzimática (TANG et al., 2023). Em nosso estudo, atividade de ambas as enzimas foi aumentada na presença dos hidrolisados proteicos (Tabela 2).

## CONCLUSÕES:

A concentração da protease obtida a partir da fermentação semissólida da farinha de proteínas de larvas da mosca soldado-negra foi satisfatória e resultou em um aumento de 31,5% na atividade específica da enzima semipurificada em comparação ao extrato bruto. Além disso, a biomassa da fermentação se mostrou um substrato adequado para a produção de peptídeos bioativos por meio de hidrólise enzimática. Para atividade antioxidante e o grau de hidrólise, os melhores resultados foram obtidos após 120 minutos, enquanto para a atividade anti-hipertensiva, em 15 minutos, foi alcançada uma inibição de 75% da ECA.

## BIBLIOGRAFIA


AGUILAR-TOALÁ, J.E.; VIDAL-LIMÓN, A.M.; LICEAGA, A.M. **Advancing Food Security with Farmed Edible Insects: Economic, Social, and Environmental Aspects**. Insects, v. 16, 2025.

AGYEI, D.; ONGKUDON, C.M.; WEI, C.Y.; CHAN, A.S.; DANQUAH, M.K**. Bioprocess challenges to the isolation and purification of bioactive peptides.** Food and Bioproducts Processing, v. 98, 2016.

AMARAL, Y. M. S., CASTRO, R. J. S. **Chicken viscera meal as substrate for the simultaneous production of antioxidant compounds and proteases by *Aspergillus oryzae*.** Bioprocess and Biosystems Engineering, v. 46, p. 1777–1790, 2023.

AMARAL, Y. M. S., DA SILVA, O. S., DE OLIVEIRA, R. L., PORTO, T. S. Production, extraction, and thermodynamics protease partitioning from *Aspergillus tamarii* Kita UCP1279 using PEG/sodium citrate aqueous two-phase systems. Preparative Biochemistry & Biotechnology, v. 50, n. 6, p. 619–626, 2020.

BATISH, I.; BRITS, D.; VALENCIA, P.; MIYAI, C.; RAFEEQ, S.; XU, Y.; GALANOPOULOS, M.; SISMOUR, E.; OVISSIPOUR, R. **Efeitos da hidrólise enzimática nas propriedades funcionais, atividade antioxidante e estrutura proteica da proteína da mosca-soldado-negra (*Hermetia illucens*).** Insetos, 2020.

CASTRO, R. J. S.; OHARA, A.; NISHIDE, T. G.; ALBERNAZ, J. R. M.; SOARES, M. H.; SATO, H. H**. A new approach for proteases production by *Aspergillus niger* based on the kinetic and thermodynamic parameters of the enzymes obtained**. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 4, n. 2, 2015.

CASTRO, R.J.S.; SATO, H.H. **A response surface approach on optimization of hydrolysis parameters for the production of egg white protein hydrolysates with antioxidant activities**. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 4, n. 1, 2015.

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, n. May 2021, 2022.

HARTMANN, C.; SHI, J.; GIUSTO, A.; SIEGRIST, M. **The psychology of eating insects: A cross-cultural comparison between Germany and China.** Food Quality and Preference, v. 44, 2015.

MATOS, F. M., RASERA, G. B., CASTRO, R. J. S. **Insects as a sustainable source of emerging proteins and their processing to obtain bioactive compounds: an updated review.** Sustainable Food Technology, 2024.

MOUITHYS-MICKALAD, A.; SCHMITT, E.; DALIM, M.; FRANCK, T.; TOME, N.M.; VAN SPANKEREN, M.; SERTEYN, D.; PAUL, A. **Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) Larvae Protein Derivatives: Potential to Promote Animal Health**. Animals, 2020.

MUÑOZ-SEIJAS, N.; FERNANDES, H.; OUTEIRIÑO, D.; MORÁN-AGUILAR, M.G.; DOMÍNGUEZ, J.M.; SALGADO, J.M**. Potential use of frass from edible insect *Tenebrio molitor* for proteases production by solid-state fermentation.** Food and Bioproducts Processing, v. 144, p. 146–155, 2024.

PASTRANA-PASTRANA, Á.J.; RODRÍGUEZ-HERRERA, R.; SOLANILLA-DUQUE, J.F.; FLORES-GALLEGOS, A.C. **Plant proteins, insects, edible mushrooms and algae: more sustainable alternatives to conventional animal protein.** Journal of Future Foods, v. 5, n. 3, 2025.

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, n. 3, p. 294–300, 2019.

SANTOS, K. L. DE O.; DACCACHE, I. S. C.; DE CASTRO, R. J. S**. Synergistic Action of Multiple Enzymes Resulting in Efficient Hydrolysis of Banana Bracts and Products with Improved Antioxidant Properties.** Processes, v. 10, n. 9, 2022.

SOUSA, P.; BORGES, S.; PINTADO, M. **Enzymatic hydrolysis of insect: *Alphitobius diaperinus* towards the development of bioactive peptide hydrolysates.** Food and Function, v. 11, n. 4, p. 3539–3548, 2020.

TANG, X.; CHEN, X.; WANG, H.; YANG, J.; LI, L.; ZHU, J.; LIU, Y. **Virtual Screening Technology for Two Novel Peptides in Soybean as Inhibitors of α-Amylase and α-Glucosidase**. Foods, 2023.