Interação molecular entre as proteínas da larva da mosca soldado negro (*Hermetia illucens*) e vanilina: efeitos da estrutura proteica e potencial tecno-funcional

Palavras-Chave: insetos, propriedades estruturais, composto de aroma

Autores(as):

Camila Viselli Suzin - FEA/UNICAMP

Wesley da Luz - FEA/UNICAMP

Prof. Dr. Guilherme M. Tavares - FEA/UNICAMP

INTRODUÇÃO:

O crescimento acelerado da população mundial impõe um desafio urgente à segurança alimentar, especialmente no que diz respeito ao fornecimento sustentável de fontes proteicas. Estimativas apontam que até 2050 a demanda global por alimentos pode atingir patamares alarmantes e a necessidade de proteína de origem animal pode dobrar durante esse período (FAO, 2011). Frente às limitações dos sistemas agropecuários convencionais, marcados por altos custos ambientais e uso intensivo de recursos e emissões de gases de efeito estufa, torna-se necessário explorar fontes proteicas alternativas, eficientes e sustentáveis. Nesse contexto, os insetos comestíveis vêm ganhando destaque, especialmente a larva da mosca soldado negro (*Hermetia illucens*), que apresenta elevado teor proteico, além de vantagens ambientais como menor uso de recurso hídrico e terra. Apesar do seu perfil nutricional robusto, a BSFL apresenta fatores sensoriais indesejáveis, como sabor e odor característicos de insetos, que dificultam o consumo desse alimento por uma grande parte da população. Uma tentativa de contornar esses gargalos seria a modulação dessas características por meio de interações com compostos fenólicos, como por exemplo, a vanilina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído) que já é bastante utilizada na indústria de alimentos devido ao seu sabor doce e aroma de baunilha (MIRON, et al 2019). Dessa forma, este estudo teve como objetivos (i) investigar a interação molecular entre as proteínas da larva da mosca soldado negro (BSFL) e a vanilina, e (ii) avaliar o impacto do tratamento térmico (70°C, 80°C e 90°C por 10 min) sobre essas interações, com foco nas alterações estruturais das proteínas e no potencial de aplicação em sistemas alimentares.

METODOLOGIA:

Extração de proteínas e preparo das dispersões proteicas

Para o desenvolvimento desse projeto, foi utilizado proteínas liofilizadas de BSFL obtidas através de um processo de extração de solubilização alcalina em pH 10 (NaOH 1M) seguida de

precipitação isoelétrica (pH 4,5, HCl 1M). A concentração de proteínas presentes no extrato foi quantificada através do método de Lowry, utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. Após a quantificação das proteínas, foram preparadas quatro dispersões proteicas a 2% m/v, três delas foram submetidas aos respectivos tratamentos térmicos de 70°C, 80°C e 90°C por 10 min. Uma alíquota sem tratamento térmico foi utilizada como tratamento controle.

Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

SDS-PAGE foi utilizada para avaliar a distribuição de massa molecular das proteínas de BSFL antes e após os tratamentos térmicos. As dispersões (5% m/v) tratadas termicamente ou não, foram centrifugadas, e os sobrenadantes e pellets foram misturados com tampão Laemmli sob condições redutoras e aquecidos a 95 °C por 4 minutos. A separação foi realizada em gel de 12% de acrilamida utilizando sistema Mini-PROTEAN (Bio-Rad) a 120 V com um tempo de corrida de 1h 30min. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue G-250, e as bandas foram comparadas a um marcador padrão de 10 a 250 kDa. A abundância relativa das bandas foi estimada por densitometria com o software ImageJ.

Índice de Hidrofobicidade superficial (H0)

A hidrofobicidade superficial da proteína de BSFL tratadas ou não termicamente foi determinada usando uma sonda de fluorescência (ANS). As dispersões proteicas (0,02% m/v) foram diluídas em diferentes concentrações (0,0025; 0,005; 0,0075; 0,010; 0,012 e 0,15 %) com tampão fosfato 10 mM, pH 7. Para a análise, foram utilizados 10 µL de solução de ANS 8 mM preparada no mesmo tampão em 2 mL de cada dispersão de proteína diluída e a intensidade de fluorescência extrínseca foi medida usando um leitor de fluorescência Synergy Mx (Biotek Instruments, Winooski, EUA) após 15 minutos de incubação no escuro. O comprimento de onda de excitação foi de 390 nm e o espectro de emissão foi coletado entre 420 a 670 nm. Para o controle, foram utilizados a solução de ANS e as dispersões de proteína sem adição de ANS.

***Quenching* de Fluorescência**

A técnica de supressão (*quenching*) da fluorescência intrínseca das proteínas de BSFL tratadas ou não termicamente foi realizada para caracterizar a interação das dispersões proteicas com a vanilina. Em resumo, as dispersões proteicas (2% m/v) foram preparadas em tampão fosfato 10 mM (pH 7) e posteriormente submetidas aos respectivos tratamentos térmicos. A solução estoque de vanilina (170 µM) foi incorporada às dispersões proteicas (2 mL volume total, 0,002% de BSFL) em diferentes concentrações (concentração final 8,1 µM) por meio do preparo independente de cada solução, em seu respectivo tubo, contendo a dispersão proteica e o volume necessário da solução estoque de vanilina para atingir a concentração desejada. Os espectros de emissão de fluorescência intrínseca das misturas foram coletados entre 300 e 500 nm, utilizando um leitor de placas Synergy Mx (Biotek Instruments, Winooski, EUA) e comprimento de onda de excitação de 280 nm, além disso, foram coletados espectros de absorbância das misturas entre 250 e 400 nm para correção do efeito de filtro interno (LAKOWICZ, 2006).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

A distribuição da massa molecular das proteínas de BSFL revelou alterações significativas tanto na fração solúvel (Figura 1A) quanto no pellet (Figura 1B) em resposta aos diferentes tratamentos térmicos aplicados. Em relação a fração solúvel, observa-se que o tratamento controle apresenta duas regiões principais, entre 50 kDa e 75 kDa, cuja intensidade, quando comparado com o tratamento controle, diminuiu gradativamente quando aplicado os tratamentos térmicos de 70°C (96,4%), 80°C (92,6%) e 90 °C (68,2%) respectivamente (RABANI et al. 2018).

Em relação ao gel da fração insolúvel (pellet), observou-se regiões mais intensas entre 50 kDa e 75 kDa, outra região mais tênue entre 25 e 37 kDa, além de regiões mais difusas abaixo de 15 kDa. Apesar da perda evidente de proteínas no sobrenadante nas faixas entre 50 kDa e 75 kDa, não foi observado um aumento proporcional de intensidade nas bandas da fração do pellet, o que inicialmente não era esperado, considerando que proteínas desnaturadas tendem a se agregar e precipitar sob aquecimento, diminuindo a abundância na fração solúvel e aumentando a abundância da fração insolúvel (SANTIAGO et al., 2021).

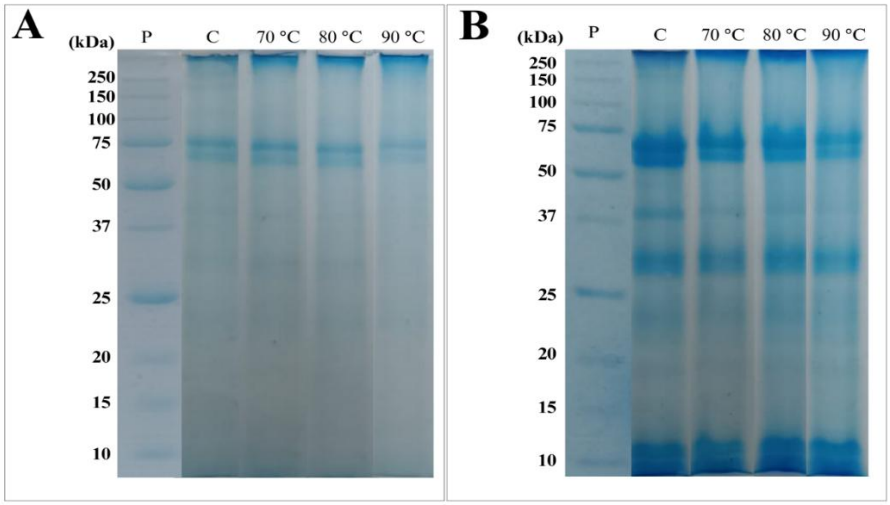

Figura 1. Análise SDS-PAGE da fração solúvel (A) e pellet (B) do extrato proteico de BSFL submetidos ou não a tratamentos térmicos (70 °C, 80 °C e 90 °C por 10 min), onde P = Padrão e proteína e C = Tratamento controle (sem tratamento térmico).

Índide de Hidrofobicidade superficial (H0)

Neste estudo, observou-se um aumento nos valores de fluorescência para os tratamentos Controle (951), 70 °C (1.122) e 80 °C (1.615), indicando maior exposição hidrofóbica possivelmente causada por desnaturação parcial. No entanto, a 90 °C, houve uma queda para 1.085, indicando uma possível formação de agregados que limitaram o acesso da ANS nessas regiões. Resultado semelhante foi descrito por Santiago, Fadel e Tavares (2021) em isolados de *Gryllus assimilis*, nos quais o aquecimento acima de 85 °C promoveu redução da hidrofobicidade por agregação proteica.

***Quenching* de Fluorescência**

Os dados do *quenching* de fluorescência da mistura proteínas de BSFL submetidas ou não a tratamentos térmicos e vanilina foram avaliados com o modelo de Stern-Volmer. A análise gráfica dos

espectros de emissão de fluorescência (Figura 2), obtidos a partir da excitação a 280 nm, revelou um perfil típico de supressão de fluorescência com o aumento da concentração de vanilina, indicando interação entre o triptofano presente na proteína de BSFL e o composto fenólico. Para todos os tratamentos, observou-se uma diminuição gradual na intensidade de fluorescência à medida que a vanilina era adicionada, o que é característico do efeito de *quenching*.

Os valores de K_{SV} obtidos para o tratamento controle, 70°C, 80°C e 90°C foram de 4,89 x10^4 M^{-1}; 5,08 x10^4 M^{-1}, 6,53 x10^4 M^{-1} e 5,11 x10^4 M^{-1} respectivamente. Observa-se um aumento progressivo na constante de Stern-Volmer do controle ao tratamento de 80°C, o que sugere que o tratamento térmico induziu modificações conformacionais na proteína, promovendo maior exposição de resíduos aromáticos, favorecendo a interação com a vanilina. Por outro lado, o tratamento a 90°C resultou em um leve decréscimo, indicando possível início de processos de agregação proteica, limitando a eficiência do *quenching* mesmo diante de uma desnaturação mais pronunciada.

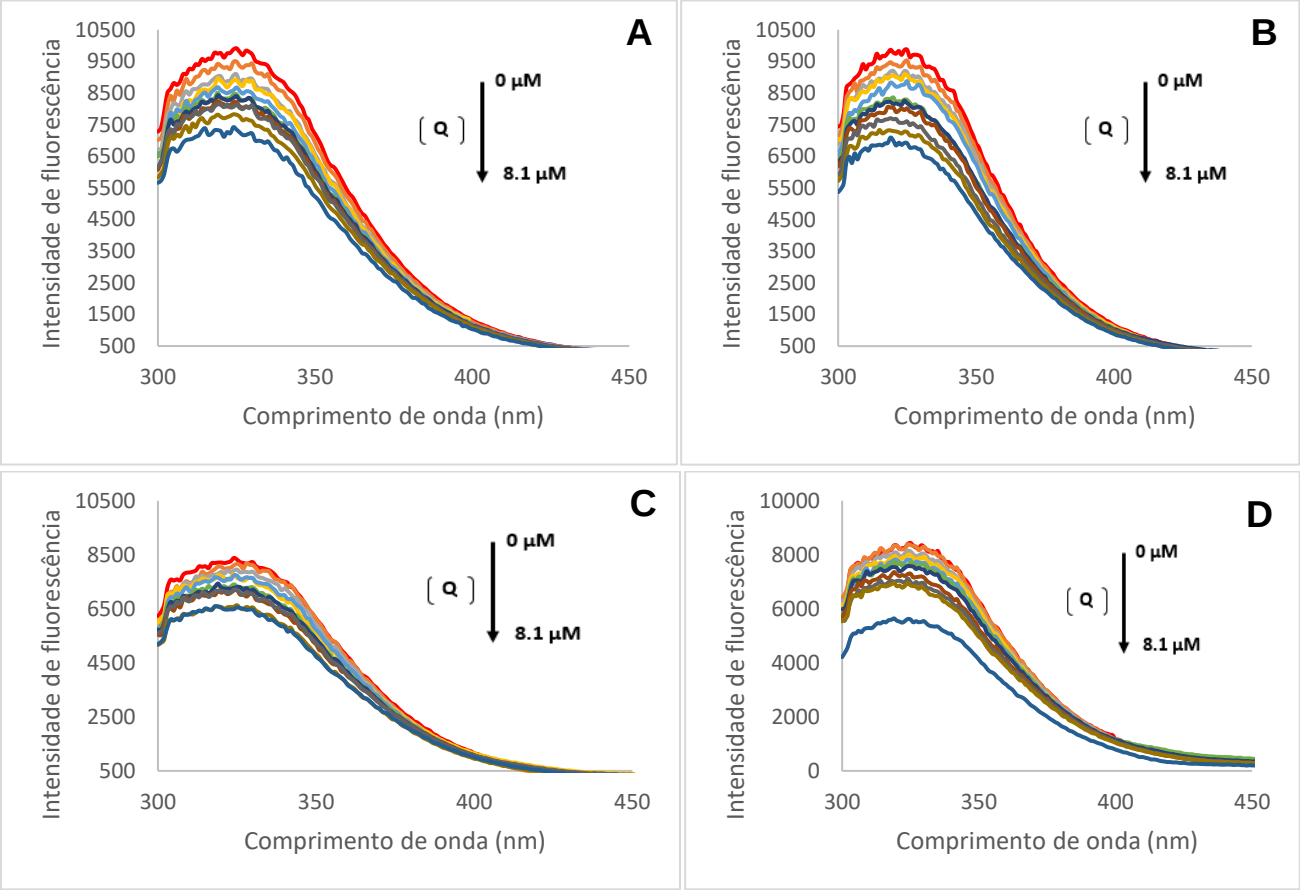

Figura 2. Espectros de emissão de fluorescência intrínseca de proteínas de BSFL tratadas ou não termicamente (A: controle, B: 70°C, C: 80°C, D: 90°C) na presença e ausência de concentrações crescentes de vanilina.

CONCLUSÕES:

Os resultados obtidos nas análises de SDS-PAGE, hidrofobicidade superficial e *quenching* de fluorescência demonstraram que o tratamento térmico influencia significativamente a estrutura e a funcionalidade das proteínas da larva da mosca soldado negro. Temperaturas moderadas (70 °C e 80 °C) promoveram maior exposição de regiões hidrofóbicas e de resíduos aromáticos, favorecendo a

interação com compostos fenólicos como a vanilina. Em contrapartida, o tratamento a 90 °C indicou início de agregação proteica, reduzindo a acessibilidade dos sítios de interação. Dessa forma, os dados apontam para um comportamento estrutural dependente da temperatura, evidenciando o potencial da modulação térmica como ferramenta para o ajuste das propriedades funcionais dessas proteínas.

BIBLIOGRAFIA

FAO. Looking at edible insects from a food safety perspective: Challenges and opportunities for the sector. 1. ed. Rome, Italy: FAO, 2021.

LAKOWICZ, J. R. Principles of fluorescence spectroscopy. [s.l.] Springer, 2006.

LENI, G.; CALIGIANI, A.; SFORZA, S. *Killing method affects the browning and the quality of the protein fraction of Black Soldier Fly (Hermetia illucens) prepupae: a metabolomics and proteomic insight.* Food Research International, [S. l.], v. 115, p. 116–125, 2019.

MIRON, L. T. et al. Preliminary Evaluation of Aqueous Protein Extraction from Black Soldier Fly Larvae (*Hermetia illucens L*.). **Industrial Biotechnology**, v. 15, n. 6, p. 365‑369, 1 dez. 2019.

RABANI, V.; CHEATSAZAN, H.; DAVANI, S. Proteomics and Lipidomics of Black Soldier Fly (Diptera: Stratiomyidae) and Blow Fly (Diptera: Calliphoridae) Larvae. **Journal of Insect Science**, v. 19, n. 3, 1 maio 2019.

SANTIAGO, A. D.; FADEL, A.; TAVARES, G. M. Thermal aggregation of black cricket (*Gryllus assimilis*) protein isolate. ***Food Research International***, [S. l.], v. 106, p. 383–390, 2018.