

HELOÍSA DE FÁTIMA MENDES JUSTINO

**HIDRÓLISE DA PROTEÍNA DO GRILO PRETO (*Gryllus assimilis*)
POTENCIALIZADA POR ULTRASSOM: EFEITO NA CINÉTICA DE HIDRÓLISE,
SOLUBILIDADE E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Bruno Ricardo de C. Leite Júnior

Coorientadora: Aline Artigiani Lima Tribst

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

Justino, Heloísa de Fátima Mendes, 1997-
J96h Hidrólise da proteína do grilo preto (*Gryllus assimilis*) potencializada por ultras-
2023 som: efeito na cinética de hidrólise, solubilidade e atividade antioxidante / Heloísa de
Fátima Mendes Justino. - Viçosa, MG, 2023.
1 dissertação eletrônica (66 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Bruno Ricardo de Castro Leite Júnior.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Tec-
nologia de Alimentos, 2023.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.196>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Insetos comestíveis. 2. Proteínas de insetos. 3. Hidrólise. 4. Hidrolisados de pro-
teína. 5. Sonicação. I. Leite Júnior, Bruno Ricardo de Castro, 1989-. II. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-Gra-
duação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. Título.

CDD 22. ed. 641.696

Bibliotecário(a) responsável: Bruna Silva CRB-6/2552

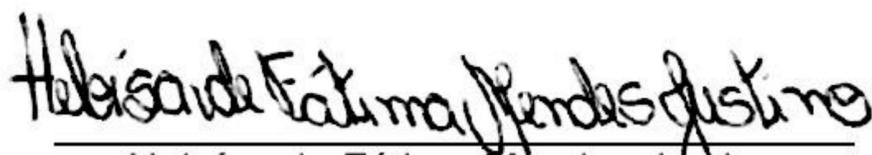
HELOÍSA DE FÁTIMA MENDES JUSTINO

**HIDRÓLISE DA PROTEÍNA DO GRILO PRETO (*Gryllus assimilis*),
POTENCIALIZADA POR ULTRASSOM: EFEITO NA CINÉTICA DE HIDRÓLISE,
SOLUBILIDADE E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de fevereiro de 2023.

Assentimento:



Heloísa de Fátima Mendes Justino

Autora



Bruno Ricardo de Castro Leite Júnior

Orientador

AGRADECIMENTOS

A jornada até aqui não foi fácil, muitas coisas não ocorreram conforme esperava, mas foram essenciais para o meu desenvolvimento pessoal e profissional. Nesse caminho eu não estava só, e agradecer é acima de tudo reconhecer que não estamos sozinhos em nossas batalhas.

Agradeço a Deus, que ao longo deste processo sempre esteve ao meu lado, e todas às vezes que eu desanimava, Ele fornecia força para continuar.

A minha família, por todo amor, paciência e compreensão. Gratidão por sempre acreditarem no meu potencial. Aos meus amigos, que apesar da distância sempre estiveram ao meu lado durante essa jornada.

Ao meu orientador, professor Bruno Ricardo de Castro Leite Júnior, à coorientadora Aline Artigiani Lima Tribst, e aos membros da banca, professora Érica Nascif Rufino, professor Vitor Manuel Ramalheira Martins e professor Paulo Henrique Costa Paiva.

Aos professores do IF Sudeste MG- Campus Rio Pomba, que fizeram parte da minha formação desde o ensino técnico. À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

JUSTINO, Heloísa de Fátima Mendes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2023. **Hidrólise da proteína do Grilo Preto (*Gryllus assimilis*) potencializada por ultrassom: efeito na cinética de hidrólise, solubilidade e atividade antioxidante.** Orientador: Bruno Ricardo de Castro Leite Júnior. Coorientadora: Alline Artigiani Lima Tribst.

A população mundial encontra-se em crescimento, ocasionando a busca constante por novas fontes de alimentos que possuam alto valor nutricional e sejam produzidas de maneira sustentável. O Grilo Preto (*Gryllus assimilis*) é uma fonte de proteína com grande potencial de uso na obtenção de peptídeos bioativos e técnico-funcionais. Atualmente, a hidrólise enzimática é o principal método de obtenção desses peptídeos, porém possui desvantagens tecnológicas como o longo tempo de processo, alto custo e baixo rendimento. Nesse sentido, o uso de tecnologias emergentes, como o ultrassom (US), têm sido uma estratégia empregada para melhorar a performance enzimática e otimizar o processo de obtenção dos hidrolisados. Este estudo investigou a aplicação da tecnologia de ultrassom como potencializadora da hidrólise enzimática das proteínas de grilo preto (*Gryllus assimilis*) e seu impacto na solubilidade e atividade antioxidante dos hidrolisados obtidos. Primeiramente foi testada a aplicação do ultrassom (23,8 W/L, 25 kHz/ 25, 40 ou 60 °C/ até 180 min) sobre enzima (Alcalase®) e substrato (*Gryllus assimilis*) separadamente. A avaliação dos processos foi realizada pela determinação da atividade enzimática obtida com a enzima sonicada ou sobre o substrato processado, sendo observados, como melhores resultados, aumentos que variaram de 59,4 a 148,5% após processamento de enzima (30 min a 25°C) e substrato (30 min a 40°C), respectivamente. Os ensaios cinéticos mostraram que a hidrólise da proteína de grilo preto (PGP) sob estas condições de maior aumento de atividade alcançadas pela pré-sonicação ou em reações assistidas por US resultou em um aumento de até 227% na taxa de proteólise. Além disso, a utilização do PGP pré-processada por US (30'/40°C) aumentou o grau de hidrólise em 52,2% comparado ao processo convencional após 180 min de reação à 60 °C. Conseqüentemente, os hidrolisados obtidos com a intervenção do US apresentaram melhor capacidade antioxidante (47,8 para DPPH e 113,6% para ABTS) e maior solubilidade (9,7%) em relação àqueles obtidos pela hidrólise convencional. Portanto, a utilização do banho ultrassônico, tanto no pré-

tratamento do substrato como para realização de hidrólise assistida, se mostrou uma estratégia promissora para aplicação na indústria alimentícia visando potencializar a produção de hidrolisados com melhores propriedades biológicas e técnico-funcionais.

Palavras-chave: Grau de hidrólise. Grilo Preto. Propriedades biológicas. Propriedades técnico-funcionais. Proteína de inseto. Sonicação.

ABSTRACT

JUSTINO, Heloísa de Fátima Mendes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2023. **Hydrolysis of Black Cricket (*Gryllus assimilis*) protein enhanced by ultrasound: effect on hydrolysis kinetics, solubility and antioxidant activity.** Adviser: Bruno Ricardo de Castro Leite Júnior. Co-adviser: Aline Artigiani Lima Tribst.

The world population is growing, causing the constant search for new food sources that have high nutritional value and are produced in a sustainable way. Black Cricket (*Gryllus assimilis*) is a source of protein with great potential for use in obtaining bioactive and technical-functional peptides. Currently, enzymatic hydrolysis is the main method to obtain these peptides, but it has technological disadvantages such as long process time, high cost and low yield. In this sense, the use of emerging technologies, such as ultrasound (US), has been a strategy employed to improve the enzymatic performance and optimize the process to obtain hydrolysates. This study investigated the application of ultrasound technology to enhance the enzymatic hydrolysis of black cricket (*Gryllus assimilis*) proteins and its impact on the solubility and antioxidant activity of the hydrolysates obtained. Firstly, the application of ultrasound (23.8 W/L, 25 kHz/ 25, 40 or 60 °C/ up to 180 min) was tested on enzyme (Alcalase®) and substrate (*Gryllus assimilis*) separately. The evaluation of the processes was carried out by determining the enzymatic activity obtained with the sonicated enzyme or on the processed substrate. The best results were increases ranging from 59.4 to 148.5% after enzyme (30 min at 25°C) and substrate (30 min at 40°C) processing, respectively. Kinetic assays showed that hydrolysis of black cricket protein (PGP) under these conditions of highest activity increase achieved by pre-sonication or in US-assisted reactions resulted in an increase of up to 227 % in the proteolysis rate. Furthermore, the use of PGP pre-processed by US (30'/40°C) increased the degree of hydrolysis by 52.2% compared to the conventional process after 180 min of reaction at 60 °C. Consequently, the hydrolysates obtained with the intervention of US showed better antioxidant capacity (47.8 for DPPH and 113.6% for ABTS) and higher solubility (9.7%) compared to those obtained by conventional hydrolysis. Therefore, the use of ultrasonic bath, both in the pre-treatment of the substrate and to perform assisted hydrolysis, proved to be a promising strategy for application in the food industry aiming to enhance the production of hydrolysates with better biological and technical-functional properties.

Keywords: Degree of hydrolysis. Black Cricket. Biological properties. Technical-functional properties. Insect protein. Sonication.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

Figura 1 – Princípio da cavitação ultrassônica.....26

Figura 2 – Processo ultrassônico. (a) Método direto; (b) Método indireto.....27

CAPÍTULO 2

Figura 1 – Desenho experimental do estudo.....41

Figura 2 – Efeito da temperatura na atividade enzimática relativa (AER) da Alcalase® em proteína de grilo preto (*Gryllus assimilis*).....47

Figura 3 –. Atividade enzimática relativa medida a 60 °C/pH 7,50 em proteína de grilo preto (*Gryllus assimilis*) (PGP) usando Alcalase® (A, B e C = AERE, Eq. (2)) ou PGP (D, E e F = AERS, Eq. (2)) pré-tratados por ultrassom por até 180 min em diferentes temperaturas (25, 40 e 60 °C).....48

Figura 4 – Hidrólise da proteína de grilo preto (PGP) por Alcalase® em diferentes temperaturas (25 °C, 40 °C, 60 °C) usando Alcalase® pré-tratada com US e PGP sob condições potencializadas ou assistidas por ultrassom.....50

Figura 5 –.Solubilidade da proteína (%) de grilo preto (PGP) hidrolisada por 30, 60 e 180 min a 60 °C usando Alcalase® pré-tratada com US e PGP sob condições potencializadas ou assistida por ultrassom.....53

Figura 6 – Atividade antioxidante in vitro dos ensaios (A) DPPH e (B) ABTS da PGP hidrolisada por até 180 min a 60 °C usando Alcalase® pré-tratada com US e PGP sob condições potencializadas ou assistida por ultrassom.....55

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 – Composição nutricional de algumas espécies de insetos comestíveis e bovino e suíno expresso em g/100g de matéria seca.....16

Tabela 2 – Composição de aminoácidos de algumas espécies de insetos comestíveis (g/100g de proteína) em base seca19

Tabela 3 – Classificação internacional das enzimas.....21

Tabela 4 – Obtenção de peptídeos bioativos a partir de insetos comestíveis utilizando diferentes preparações enzimáticas e a bioatividade relacionada.....23

CAPÍTULO 2

Tabela 1 – Parâmetros da Eq. (4) ajustado para hidrólise de Alcalase® em proteína de grilo preto (PGP) em diferentes temperaturas de reação usando Alcalase® pré-tratada com ultrassom e PGP sob condições potencializadas ou assistidas por ultrassom.....51

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| INTRODUÇÃO GERAL | 12 |
| OBJETIVOS | 14 |
| Objetivo Geral | 14 |
| Objetivos Específicos | 14 |
| CAPÍTULO 1 | 15 |
| REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 15 |
| 1. Insetos comestíveis | 15 |
| 2. Grilo Preto (<i>Gryllus assimilis</i>) como fonte de proteína | 18 |
| 3. Enzimas utilizadas na hidrólise proteica | 20 |
| 4. Hidrolisados proteicos e suas propriedades biológicas e técnico-funcionais | 22 |
| 5. Aplicação do Ultrassom na melhoria da performance enzimática na hidrólise proteica | 25 |
| 7. Referências | 30 |
| CAPÍTULO 2..... | 36 |
| HIDRÓLISE DA PROTEÍNA DO GRILO PRETO (<i>Gryllus assimilis</i>) POTENCIALIZADA POR ULTRASSOM: EFEITO NA CINÉTICA DE HIDRÓLISE, SOLUBILIDADE E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE | 37 |
| 1. INTRODUÇÃO | 39 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 40 |
| 2.1 Obtenção da enzima e proteína de grilo preto (<i>Gryllus assimilis</i>) (PGP) | 41 |
| 2.2 Determinação da atividade da Alcalase® em proteína de grilo preto (<i>Gryllus assimilis</i>) em diferentes temperaturas | 42 |
| 2.3 Efeito do pré-tratamento por ultrassom sobre a proteína de grilo preto (<i>Gryllus assimilis</i>) e Alcalase®: Avaliação da atividade enzimática | 42 |
| 2.4 Avaliação da cinética de hidrólise da proteína do grilo preto (<i>Gryllus assimilis</i>) usando enzima e substrato pré-tratados com US em condições potencializadas e sob reação assistida | 43 |
| 2.4.1 Hidrólise da PGP usando substrato e enzima pré-tratados por US em condições potencializadas | 43 |
| 2.4.2 Hidrólise da PGP assistida por ultrassom | 44 |
| 2.4.3 Determinação do grau de hidrólise (GH) | 44 |
| 2.4.4 Modelagem da cinética da hidrólise da proteína de grilo preto (<i>Gryllus assimilis</i>) | 45 |
| 2.5 Avaliação da solubilidade e atividade antioxidante <i>in vitro</i> | 45 |
| 2.6 Desenho experimental e análise estatística | 45 |
| 3. RESULTADOS | 46 |

| | |
|-------------------------|----|
| 4. DISCUSSÃO | 55 |
| 5. CONCLUSÃO..... | 60 |
| 6. AGRADECIMENTOS | 60 |
| 7. REFERÊNCIAS..... | 61 |
| CONCLUSÃO GERAL | 66 |

INTRODUÇÃO GERAL

Estima-se que no ano de 2050 a população mundial chegue a 9 bilhões de pessoas (FAO, 2013), tornando a produção suficiente de alimentos um grande desafio, especialmente em termos de fontes proteicas (MONTOWSKA et al., 2019). Nesse sentido, uma alternativa oportuna é a entomofagia, ou seja, a prática de comer insetos, dado seu alto valor nutricional e menor impacto ambiental, quando comparado ao consumo de proteínas animais de fontes tradicionais (MANDITSERÁ et al., 2019).

Atualmente, a entomofagia é uma prática comum em países localizados na Ásia, África e América Latina (VAN HUIS, 2022; DE CASTRO et al., 2018). Há registros que mais de 2000 espécies de insetos podem ser consumidas, sendo os mais comuns os pertencentes às ordens *Coleoptera*, *Lepidoptera*, *Hymenoptera* e *Orthoptera*. No Brasil, os principais insetos produzidos são o grilo preto (*Gryllus assimilis*) e o tenébrio gigante (*Zophobas morio*), sendo destinados principalmente para a alimentação animal (ARAÚJO et al., 2019). A Associação Brasileira de Criadores de Insetos afirma que cerca de 12 toneladas de insetos são produzidas por mês no Brasil, dos quais 23 % são destinados ao consumo humano. Os insetos destinados à alimentação humana vêm sendo inseridos na formulação de diversos produtos, como, por exemplo, doce de damasco com grilo, barras de chocolate com larvas, sorvete de pistache com insetos, suplemento proteico de farinha de grilo e barras proteicas (RODRIGUES, 2019).

Os insetos são ricos em nutrientes, exibindo em base seca uma média de 35-61 % de proteínas, 13-33 % de lipídios e uma quantidade significativa de fibra na forma de quitina insolúvel (OJHA et al., 2021). A fração proteica apresenta aminoácidos essenciais e possui boa digestibilidade (BEDNÁŘOVÁ; BORKOVCOVÁ; KOMPRDA, 2014). Deste modo, a composição dos insetos tem chamado a atenção dos pesquisadores, com destaque para as proteínas que podem fornecer peptídeos bioativos (NONGONIERMA; FITZGERALD, 2017).

Peptídeos bioativos são fragmentos proteicos com uma sequência de aminoácidos específicos que podem exercer atividades biológicas, como atividade antioxidante, antidiabética, anti-hipertensiva, antimicrobiana, antitrombótica, anticancerígena, entre outras (YAN et al., 2019). Esses compostos apresentam baixa toxicidade, tendem a não se acumular nos tecidos, possuem grande diversidade

estrutural e baixa massa molecular, apresentando potencial para uso como nutracêutico (MAJID; PRIYADARSHINI, 2019).

Os peptídeos bioativos podem ser obtidos por hidrólise enzimática ou química (TOLDRÁ et al., 2020). Apesar da hidrólise enzimática ser o método mais utilizado para a obtenção de hidrolisados proteicos, é uma operação que apresenta desafios como alto custo, longo tempo e baixo grau de hidrólise. Com isso, novas estratégias têm sido adotadas para otimizar a estabilidade e a performance de enzimas para potencializar as reações enzimáticas. Uma tecnologia que vem sendo empregada é o ultrassom (US), em que a cavitação acústica gerada pode promover mudanças conformacionais na estrutura da enzima e do substrato, bem como acelerar o processo de hidrólise nas reações assistidas.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo geral investigar como a tecnologia de ultrassom pode ser utilizada para potencializar a hidrólise enzimática das proteínas de grilo preto (*Gryllus assimilis*) visando a obtenção de hidrolisados com melhores propriedades técnico-funcionais e peptídeos potencialmente bioativos com qualidade, rendimento adequado e compatíveis com a aplicação industrial.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a aplicação da tecnologia de ultrassom para potencializar a hidrólise enzimática das proteínas de grilo preto (*Gryllus assimilis*) e seu impacto na solubilidade e atividade antioxidante *in vitro* dos hidrolisados obtidos.

Objetivos Específicos

- Determinar a temperatura ótima de atividade da Alcalase® usando as proteínas do Grilo Preto (*Gryllus assimilis*) como substrato;
- Avaliar o efeito da temperatura (25, 40, 60 °C) e do tempo de processo (0 a 180 min) de US (23,8 W/L, 25 kHz), na atividade enzimática relativa após o processamento da enzima e do substrato;
- Determinar os parâmetros cinéticos da hidrólise enzimática da PGP utilizando a enzima (Alcalase®) e substrato (*Gryllus assimilis*) pré-processados por US em condições potencializadas e em reação assistida no ultrassom por até 180 min a 25, 40 e 60 °C.
- Determinar o impacto da hidrólise enzimática (enzima e substrato pré-processados por US, reação assistida por US e reação em condições convencionais) na propriedade antioxidante e na solubilidade dos hidrolisados obtidos após 30, 60 e 180 min de proteólise.

CAPÍTULO 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Insetos comestíveis

A produção de alimentos é um dos grandes desafios da humanidade, dado o crescimento exponencial da população. Estima-se que no ano de 2050 a população atinja 9,7 bilhões de pessoas, requerendo que a produção de alimentos aumente em 70 % e a de proteínas de origem animal em 100 %. Para atender a esse cenário e minimizar essa carência, a inclusão de novas fontes alimentares, como os insetos, é fortemente atrativa e recomendada (FAO, 2013; FAO, 2020).

Apesar de não ser um hábito novo, a entomofagia, isto é, o consumo de insetos como fonte alimentar, não é uma prática convencional em muitos países. No entanto, os insetos comestíveis fazem parte de dietas tradicionais em mais de 113 países, incluindo os da Ásia, África e América do Sul. Atualmente, estima-se que 2 bilhões de pessoas consomem insetos, sendo que mais de 2000 insetos são registrados como comestíveis (TAO; LI, 2018).

Os insetos destinados à alimentação podem ser obtidos por três diferentes principais estratégias: colheita direta da natureza, semi-domesticação e domesticação. É estimado que aproximadamente 92 % dos insetos comestíveis são obtidos diretamente da natureza, 6 % são semi-domesticados e apenas 2 % das espécies são criadas de forma domesticada, o que causa preocupação, pois esse elevado percentual de insetos comestíveis obtidos diretamente da natureza pode acarretar a extinção da espécie no meio ambiente (YEN, 2015).

Portanto, a criação parcial ou totalmente domesticada são as mais indicadas para produção de insetos destinados à alimentação humana e animal (FENG et al., 2018). Larvas, baratas e alguns besouros, fazem parte do grupo que podem ser totalmente domesticados. Já os gafanhotos, vespas, lagartas de bambu, larvas do gorgulho da palma e libélulas podem ser parcialmente domesticados (BAIANO, 2020).

A composição nutricional dos insetos varia de acordo com a espécie analisada, com ênfase para elevados teores de proteínas de alta qualidade, lipídios, carboidratos, minerais e algumas vitaminas (de CASTRO et al., 2018; ESKOLA et al., 2020). Em média apresentam 35-61 % de proteínas e 13-33 % de lipídios em matéria seca e uma quantidade significativa de fibra na forma de quitina insolúvel (OJHA et al., 2021), sendo que a composição varia em função da espécie de inseto e de seu estágio de

desenvolvimento (AKHTAR; ISMAN, 2018). Alguns macronutrientes presentes em insetos comestíveis desidratados, como proteína, gordura e fibras, já foram analisados e os resultados demonstraram que seus valores percentuais foram superiores a outras fontes proteicas tradicionais ocidentais, como carne bovina e suína conforme pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição nutricional de algumas espécies de insetos comestíveis e bovino e suíno expresso em g/100g de matéria seca.

| Alimento | Proteína (%) | Lipídeos (%) | Fibra (%) | Autores |
|--|--------------|--------------|-----------|--------------------------|
| Besouro rinoceronte (<i>Oryctes rhinoceros</i>) | 34,7 | 10,0 | 8,7 | Anaduaka et al., 2021 |
| Gafanhoto pintado (<i>Zonocerus variegatus</i>) | 30,7 | 20,0 | 22,0 | Anaduaka et al., 2021 |
| Larva de <i>Protaetia brevitarsis</i> (<i>Protaetia brevitarsis</i>) | 44,2 | 15,3 | 11,0 | Ghosh et al., 2017 |
| Larva-da-farinha (<i>Tenebrio molitor</i>) | 53,2 | 34,5 | 6,2 | Ghosh et al., 2017 |
| Grilo japonês (<i>Teleogryllus emma</i>) | 55,6 | 25,1 | 10,3 | Ghosh et al., 2017 |
| Grilo Africano (<i>Gryllus bimaculatus</i>) | 58,3 | 11,8 | 9,5 | Ghosh et al., 2017 |
| Grilo preto (<i>Gryllus assimilis</i>) | 62,7 | 20,9 | 8,4 | Machado e Thys, 2019 |
| Formiga verde (<i>Oecophylla smaragdina</i>) | 55,2 | 14,9 | 19,8 | Chakravorty et al., 2016 |
| Cupim (<i>Odontotermes sp.</i>) | 33,6 | 50,9 | 6,2 | Chakravorty et al., 2016 |
| Barata (<i>Dictyoptera/Blatodea</i>) | 57,3 | 29,9 | 5,3 | Rumpold e Schlüter, 2013 |
| Cigarras, percevejos, pulgões e cochonilhas (<i>Hemiptera</i>) | 48,3 | 30,3 | 12,4 | Rumpold e Schlüter, 2013 |
| Vespas, abelhas e formigas (<i>Himenoptera</i>) | 46,5 | 25,1 | 5,7 | Rumpold e Schlüter, 2013 |

| | | | | |
|---|------|------|------|-----------------------------|
| Mariposa e borboleta (<i>Lepidoptera</i>) | 45,4 | 27,7 | 6,6 | Rumpold e Schlüter, 2013 |
| Libélulas (<i>Odonata</i>) | 55,2 | 19,8 | 11,8 | Rumpold e Schlüter, 2013 |
| Gafanhotos, grilos, esperanças, wetas e paquinhas (<i>Orthoptera</i>) | 61,3 | 13,4 | 9,6 | Rumpold e Schlüter, 2013 |
| Bovina, peito, sem gordura, cru | 43,1 | 51,9 | 0 | TACO, 2011 |
| Suíno, pernil, cru | 61,0 | 33,7 | 0 | TACO, 2011 |

O incremento de insetos comestíveis na dieta humana é capaz de fornecer altos níveis de macronutrientes, muitas vezes superiores aos dos alimentos de origem animal convencional, como a carne bovina (IMATHIU, 2020). Além disso, apresentam vantagens logísticas por se reproduzirem rapidamente e possuírem ampla distribuição geográfica (MÜLLER et al., 2016; GJERRIS et al., 2016).

Do ponto de vista ambiental, em contraste com a pecuária convencional, a criação de insetos resulta em menos emissões de gases de efeito estufa, menos água e espaço necessário, menor investimento econômico, maior eficiência na taxa de conversão alimentar. Para tal cálculo, deve-se levar em consideração a porcentagem da massa corporal digestiva do inseto, a relação do kg de peso digestível/kg de alimento, litros de água por quantidade de proteína produzida e metros quadrados por quilogramas de massa corporal digestível produzida. Dentro desse segmento, os insetos comestíveis têm muitas vantagens em termos de sustentabilidade e valor nutricional, podendo apresentar de 13 a 77 % de proteína em base seca, sendo que esse valor irá variar de acordo com a espécie de inseto e seu estágio de desenvolvimento (AKHTAR; ISMAN, 2018). A título de exemplo, a produção de 1 kg de proteína de espécies de grilos e larvas requer apenas 40 L de água (ABBASI et al., 2016).

Os dois principais insetos criados em cativeiros no Brasil são o grilo preto (*Gryllus assimilis*) e o tenébrio gigante (*Zophobas morio*), sendo em sua maioria destinados à alimentação animal (ARAÚJO et al., 2019). Apesar disso, dada a pressão crescente para inclusão de insetos na alimentação humana, é necessário avaliar esses insetos como potenciais fontes de proteína para os homens, principalmente a

espécie *Gryllus assimilis*, considerando que sua abrangência na literatura científica sobre esta aplicação é limitada.

2. Grilo Preto (*Gryllus assimilis*) como fonte de proteína

Proteínas são polímeros de alto peso molecular, cujas unidades básicas são os aminoácidos, ligados entre si por ligações peptídicas. Possuem em sua cadeia carbono (50-55 %), hidrogênio (6-8 %), oxigênio (20-24 %), nitrogênio (15-18 %), enxofre (0,2-0,3 %) e algumas podem conter fósforo (BOBBIO; BOBBIO, 1989).

Do ponto de vista nutricional, a proteína é um macronutriente essencial na alimentação, pois é fonte de aminoácidos imprescindíveis para a manutenção da saúde dos indivíduos e está ligada a praticamente todas as funções fisiológicas. Além do valor nutricional, contribui para as características sensoriais dos alimentos. Diante disso, algumas empresas alimentícias e de bebidas estão fortificando seus produtos com proteínas, buscando idealmente fontes de baixo custo, sustentáveis, solúveis e com alta biodisponibilidade e funcionalidade para a formulação de novos produtos (FATHOLLAHY et al., 2021; YOUSEFI; ABBASI, 2022).

De modo geral, os grilos e gafanhotos apresentam maior teor de proteína em base seca quando comparado à outros insetos, sendo constituído de aproximadamente 61 % de proteína, valor cerca de 10 % maior do que as proteínas de libélulas e quase o dobro da proteína obtida com baratas e cupins (LICEAGA et al., 2022). Porém, já foi relatado uma grande variabilidade (> 50 %) no conteúdo proteico na mesma espécie, em certos casos. Essa variabilidade se deve a fatores extrínsecos, como alimentação e ecologia, que podem afetar a composição final (PAYNE et al., 2016). Araújo et al (2019) avaliaram a composição nutricional do grilo preto (*Gryllus assimilis*) e tenébrio gigante (*Zophobas morio*), selecionando grilos adultos acima de 25 mm e tenébrio em estágio larval com dimensões acima de 50 mm. Por meio da investigação, constatou que os insetos analisados podem ser um suprimento nutricional adequado às necessidades biológicas, dado que o grilo preto apresentou 65,52 % de proteínas, 21,80 % de lipídios, 8,6 % de carboidratos e 4,08 % de cinzas, e o tenébrio gigante 46,80 % de proteínas, 43,64 % de lipídeos, 8,17 % de cinzas e 1,39 % de carboidratos.

A qualidade da proteína de um alimento pode ser determinada pela quantidade e capacidade de fornecer todos os aminoácidos necessários para um bom desenvolvimento e manutenção das funções corpóreas e pela digestibilidade proteica

(CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2008). Os aminoácidos essenciais são aqueles que o organismo humano não consegue sintetizar e, por esse motivo, devem ser provenientes da alimentação, para que não ocorra a desnutrição. Nesse sentido, as proteínas de insetos comestíveis se destacam em sua composição, pois apresentam todos os aminoácidos essenciais (LICEAGA, 2022).

Oibiokpa et al. (2018) estudaram o conteúdo de aminoácidos do grilo preto (*Gryllus assimilis*), cupim (*Macrotermes nigeriensis*), gafanhoto (*Melanoplus foedus*) e mariposa-imperadora (*Cirina forda*) e observaram que os insetos analisados são fontes de aminoácidos essenciais e não essenciais. O grilo preto apresentou maior teor de metionina e cistina, que são aminoácidos sulfurados essenciais na dieta humana (Tabela 2).

Tabela 2 – Composição de aminoácidos de algumas espécies de insetos comestíveis (g/100g de proteína) em base seca.

| Aminoácidos | Grilo preto (<i>Gryllus assimilis</i>) | Cupim (<i>Macrotermes nigeriensis</i>) | Gafanhoto (<i>Melanoplus foedus</i>) | Mariposa- imperadora (<i>Cirina forda</i>) |
|-----------------|---|---|---|--|
| Lisina | 5,29 | 6,16 | 6,32 | 4,59 |
| Treonina | 3,09 | 4,20 | 10,60 | 5,19 |
| Valina | 4,63 | 4,92 | 6,66 | 5,10 |
| Metionina | 2,29 | 0,78 | 2,24 | 0,62 |
| Isoleucina | 3,36 | 4,31 | 1,52 | 3,68 |
| Leucina | 6,62 | 7,76 | 6,99 | 5,91 |
| Fenilalanina | 3,37 | 4,47 | 5,31 | 4,64 |
| Triptofano | 2,53 | 2,36 | 2,64 | 1,84 |
| Histidina | 2,52 | 3,07 | 5,61 | 2,08 |
| Arginina | 4,14 | 6,91 | 8,63 | 5,35 |
| Ácido aspártico | 8,25 | 6,82 | 1,67 | 7,82 |
| Serina | 3,80 | 5,10 | 5,59 | 3,80 |
| Ácido glutâmico | 10,60 | 13,00 | 5,60 | 8,94 |
| Prolina | 5,09 | 5,90 | 8,95 | 3,26 |
| Glicina | 4,03 | 6,01 | 6,92 | 5,29 |

| | | | | |
|----------|------|------|------|------|
| Alanina | 6,23 | 5,93 | 3,87 | 3,80 |
| Cistina | 1,14 | 0,40 | 0,53 | 0,66 |
| Tirosina | 4,23 | 4,76 | 7,59 | 3,81 |

Fonte: Oibiokpa et al. (2018)

A taxa de eficiência de proteína é a relação entre o ganho/perda de peso corporal pela ingestão de proteína. O grilo preto (*Gryllus assimilis*) apresenta um valor de 1,78, sendo este mais elevado quando comparado a outros insetos, como por exemplo, o cupim rainha (*Macrotermes bellicosus*: 1,18), besouro rinoceronte do coco (*Oryctes rhinoceros*: 1,15) e até mesmo a caseína, que apresenta uma taxa de eficiência de 1,22 (OIBIOKPA et al., 2018).

Além disso, o valor biológico de uma proteína pode ser entendido como a porcentagem de nitrogênio absorvido que é retido, sendo uma indicação do quão bem uma proteína é utilizada pelo organismo. Neste sentido, o valor biológico do grilo preto apresentou 93,0 %, superior ao da caseína, que é de 73,5 % (OIBIOKPA et al., 2018; OIBIOKPA, 2017). Estes resultados indicam que os insetos comestíveis, principalmente o grilo preto, têm grande potencial para expandir a participação como fonte proteica na alimentação humana.

3. Enzimas utilizadas na hidrólise proteica

As enzimas são substâncias que atuam na redução da energia de ativação necessária para que as reações ocorram (BOBBIO, BOBBIO, 1989; WHITAKER, 2003). Exceto por um pequeno grupo de moléculas de RNA catalíticas, todas as enzimas são proteínas. Em termos industriais, elas podem ser obtidas a partir de animais, plantas e microrganismos, sendo a fonte microbiana de maior preferência devido facilidade para manipulação genética, grande disponibilidade devido à ausência de sazonalidade, capacidade de produção em massa e maior estabilidade as condições do meio (RANA, WAIA, GAUR, 2013; ANBU et al., 2015). A nível industrial, as enzimas possuem ampla aplicabilidade em vários segmentos, como indústrias químicas, farmacêuticas, têxtil, papel, couro, alimentos, bebidas e biocombustíveis (KIRK, BORCHET, FUGLSANG, 2002; CHOI, HAN, KIM, 2015).

Algumas enzimas são constituídas apenas por seus próprios resíduos de aminoácidos. Outras requerem um componente químico adicional denominado

cofator, que pode ser um ou mais íons inorgânicos como Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} ou Zn^{2+} ou uma molécula orgânica ou metalorgânica complexa, denominada coenzima. As enzimas são divididas em sete classes, com base nos tipos de reações que catalisam, conforme a Tabela 3 (NELSON; COX, 2014; CREATIVE ENZYMES, 2023).

Tabela 3 – Classificação internacional das enzimas.

| Nome da classe | Tipo de reação catalisada |
|----------------|--|
| Oxidoredutases | Transferência de elétrons (íons hidrido ou átomos de H) |
| Transferases | Reações de transferência de grupos |
| Hidrolases | Reações de hidrólise (transferência de grupos funcionais para a água) |
| Liasas | Clivagem de C-C, C-O, C-N ou outras ligações por eliminação, rompimento de ligações duplas ou anéis, ou adição de grupos a ligações duplas |
| Isomerasas | Transferência de grupos dentro de uma mesma molécula produzindo formas isoméricas |
| Ligases | Formação de ligações C-C, C-S, C-O e C-N por reações de condensação acopladas à hidrólise de ATP ou cofatores similares |
| Translocases | Auxilia na movimentação de outra molécula, geralmente através de uma membrana celular |

Fonte: Nelson e Cox (2014); Creative Enzymes (2023)

As hidrolases são as enzimas mais usadas em biotransformações, isso devido sua ampla especificidade de substrato, acessibilidade comercial, independência de cofatores e capacidade de trabalhar em altas concentrações de substrato, tanto em soluções aquosas quanto em solventes orgânicos (RODRIGUES et al., 2019). Essa classe se divide em subclasses, entre elas estão as proteases, que consistem em um grupo amplo de enzimas com diferentes especificidades de substrato, diversidade de seus sítios ativos, mecanismos catalíticos, pH ótimos, temperaturas ótimas e perfis de estabilidade (MARTÍNEZ-MEDINA et al., 2019). Elas podem ser obtidas de plantas (papaína do mamão, bromelina de abacaxi, actinidina de kiwi, ficina de figo), animais (tripsina pancreática, quimotripsina, pepsina, quimosina) e microrganismos, sendo atualmente a mais difundida devido à alta demanda industrial (SANROMÁN, DEIVE, 2017; AGYEI, AKANBI, OEY, 2019; MARTÍNEZ-MEDINA et al., 2019).

A Alcalase® é uma serina endopeptidase, originalmente obtida de *Bacillus licheniformis*. É pertencente a um grupo de proteases de serina, que inicia o ataque nucleofílico sobre a ligação peptídica (amida) por meio de um resíduo de serina no local ativo, seu resíduo característico do centro ativo é Asp-32, His-64, Ser-221 dispostos em uma tríade catalítica. Entre as proteases, ela tem se destacado como uma das melhores enzimas comerciais na liberação de peptídeos bioativos, dada sua capacidade de hidrolisar diferentes grupamentos peptídicos em comparação com outras proteases e tendência em fornecer peptídeos de pequeno tamanho. Devido a ampla seletividade e especificidade, é possível sua utilização em diferentes substratos proteicos (TACIAS-PASCACIO et al., 2020; FONSECA, 2014).

A Alcalase® tem sido empregada na produção de hidrolisados proteicos de diversas fontes, como caseína de leite de cabra (MAGALHÃES et al. 2022), soja (ZHONG et al., 2007), grão de bico (YUST et al., 2003), peixe (VALENCIA et al., 2014) e inseto comestível (DE MATOS et al., 2022), visando a produção de peptídeos bioativos. Ahmadifard et al. (2016) realizaram uma comparação do efeito de três enzimas (Alcalase®, papaína e um coquetel comercial contendo tripsina, timotripsina e aminopeptidase) na hidrólise enzimática de concentrado proteico de farelo de arroz (CPFA) e proteína de soja (PS). Constataram que a Alcalase® apresentou maior capacidade de hidrólise em comparação com as outras enzimas. Após 60 minutos de hidrólise, o GH % da Alcalase® para CPFA e PS foi de 12,69 e 12,50 %, respectivamente. Por outro lado, a enzima papaína apresentou menor GH % (1,56 e 1,24 %).

4. Hidrolisados proteicos e suas propriedades biológicas e técnico-funcionais

A hidrólise enzimática é uma operação unitária que tem sido constantemente utilizada para modificar os componentes dos insetos, principalmente proteínas. Essa pode ser uma excelente estratégia para aumentar a aceitação dos insetos comestíveis enquanto ingrediente alimentício, bem como permitir a obtenção de compostos com melhores propriedades biológicas e técnico-funcionais (NONGONIERMA; FITZGERALD, 2017).

A produção de hidrolisados proteicos decorre da seleção de fontes proteicas e posterior liberação de seus fragmentos peptídicos pela quebra de ligações entre resíduos de aminoácidos. Normalmente, esse processo ocorre por ação proteolítica

de enzimas endógenas (autólise), enzimas exógenas (preparações comerciais) ou por fermentação microbiana (LI-CHAN, 2015; TOLDRÁ et al., 2018). Enzimas comerciais exógenas de origem microbiana são bastante empregadas nesse processo, como por exemplo, Alcalase®, Flavourzyme®, Pronase® e Neutrase®, dentre outras (MARCINIAK et al., 2018).

Peptídeos de baixa massa molecular, geralmente menor que 1 kDa, são considerados mais adequados para incorporação em alimentos, devido à sua absorção direta pelo sistema circulatório e maior resistência à hidrólise enzimática durante a passagem pelo trato gastrointestinal (ALUKO, 2012). Além disso, a presença de peptídeos de baixo peso molecular pode aumentar a solubilidade da proteína hidrolisada, já que a solubilidade de uma proteína é influenciada pela redução do peso molecular e aumento do número de unidades polipeptídicas menores (KILARA; PANYAM, 2003).

O processo de hidrólise é necessário para a liberação desses peptídeos que apresentam algum tipo de bioatividade, uma vez que essas moléculas apresentaram baixa bioatividade quando estão inseridas à estrutura nativa das proteínas (NGOH; GAN, 2016). Geralmente, os peptídeos bioativos são compostos por menos de 20 resíduos de aminoácidos e possuem massa molecular menor que 6 kDa (DE CASTRO; SATO, 2015). Dados referentes a diferentes processos de hidrólise (enzimas diferentes) de proteínas de insetos para produção de peptídeos bioativos são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Obtenção de peptídeos bioativos a partir de insetos comestíveis utilizando diferentes preparações enzimáticas e a bioatividade relacionada.

| Inseto comestível | Enzima (s) | Bioatividade | Referência |
|---|---------------------------------------|---|----------------------------------|
| Grilo Preto (<i>Gryllus assimilis</i>) | Flavourzyme, Alcalase Neutrase | Antidiabética Anti-hipertensiva | De Matos et al., 2022 |
| Catídideo mexicano (<i>Pterophylla beltrani</i>) | Pepsina Tripsina Quimiotripsina | Antioxidante Anti-hipertensivos Antidiabética | Montiel-Aguilar et al., 2020 |
| Cascudinho (<i>Alphitobius diaperinus</i>) | Alcalase Corolase PP | Antioxidante Anti-hipertensiva | Sousa, Borges e Pintado, 2020 |
| Mosca soldado-negro (<i>Hermetia illucens</i>) | Alcalase | Antioxidante | Mintah et al., (2019) |

| | | | |
|--|---|--|---|
| Grilo-doméstico tropical (<i>Grylodes sigillatus</i>) | Alcalase Pepsina Pancreatina | Antioxidante Antidiabética Anti-hipertensiva | Hall; Johnson; Liceaga (2018) |
| Grilo-doméstico (<i>Acheta domesticus</i>) | Pepsina Tripsina Quimotripsina Mucina | Antioxidante | David-Birman; Raften; Lesmes (2018) |
| Bicho-da-seda (<i>Bombyx mori</i>) | Alcalase Protease alcalina Pepsina Tripsina Quimotripsina | Antioxidante | Liu et al. (2017) |
| Larva-da-farinha (<i>Tenebrio molitor</i>) | Alcalase | Anti-hipertensiva | Dai; Ma; Luo (2013) |
| Traça (<i>Spodoptera littoralis</i>) | Alcalase Termolisina Pepsina Tripsina Quimotripsina | Anti-hipertensiva | Vercruysse et al. (2009) |

A hidrólise enzimática pode melhorar algumas propriedades técnico-funcionais em comparação às das proteínas nativas, como já demonstrado para uma variedade de proteínas convencionais, como proteínas de soja (LIANG et al., 2020) e proteínas do soro de leite (ZHANG et al., 2022). Na literatura, muitos estudos estão investigando a bioatividade de hidrolisados de proteínas obtidas de insetos. Por outro lado, publicações sobre as propriedades técnico-funcionais de hidrolisados de proteínas de insetos são limitadas.

Dos estudos realizados, é possível constatar que os hidrolisados proteicos de insetos resultam em maior solubilidade (MINTAH et al., 2019) e maiores capacidades de retenção de água e óleo (DION-POULIN et al., 2020), emulsificante (KIM et al., 2016) e de formação de espuma (PURSCHKE et al., 2018) do que as observadas para a proteína nativa.

A solubilidade da proteína é entendida como a quantidade de proteínas que estão em um estado solúvel sob condições específicas (HAQUE; TIMILSENA; ADHIKARI, 2016). É uma importante propriedade físico-química, pois influencia em diversos fatores, como, por exemplo, o alimento que pode ser produzido (sólido ou líquido), as fases que podem ser estabilizadas e a escolha e o tempo do processamento (HELLEBOIS et al., 2021). Portanto, a solubilidade da proteína é um

parâmetro crítico na ciência de alimentos, e o conhecimento dessa propriedade auxilia no desenvolvimento e fabricação de produtos.

Purschke et al. (2018) investigaram as propriedades técnico-funcionais dos hidrolisados proteicos da farinha de proteína de gafanhoto migratório (*Locusta migratoria*). Os autores constataram que o processo de hidrólise enzimática melhorou a solubilidade, atividade emulsificante, capacidade de espuma e capacidade de ligação de óleo em um amplo espectro de pH dos peptídeos obtidos, em comparação com a proteína nativa.

Na hidrólise enzimática, as condições de enzima-substrato, tempo de hidrólise, temperatura e pH devem ser otimizados para obtenção do composto de interesse (UDENIGWE; ALUKO, 2012). Porém, ainda que sejam otimizados, os custos relacionados a este processo são elevados, principalmente devido ao longo tempo de hidrólise e relativo baixo rendimento dos compostos de interesse. Além disso, as condições ótimas das enzimas nem sempre são as condições desejadas industrialmente, o que eleva os gastos energéticos e pode afetar a qualidade do produto. Desta forma, torna-se necessário usar fontes mais baratas de proteases e/ou utilizar tecnologias, como o ultrassom, para acelerar este processo ou garantir maiores níveis de conversão.

5. Aplicação do Ultrassom na melhoria da performance enzimática na hidrólise proteica

Devido à ampla aplicação de reações catalisadas por enzimas, elas têm recebido muita atenção visando reduzir os custos operacionais e aumentar a produção de compostos de interesse. O ultrassom (US) é uma tecnologia atraente dentro desse segmento, pois, em condições otimizadas, é capaz de promover ativação enzimática, modificação de substrato e aceleração da hidrólise enzimática (SOARES et al., 2019; SOARES et al., 2020).

O US é considerado um tipo de energia vibracional que, ao passar pelo meio como uma onda mecânica, inicia um movimento contínuo do tipo onda e gera ciclos alternados de expansão e compressão. No ciclo de expansão, as bolhas são geradas, a princípio, por causa de uma pressão negativa que supera a resistência à tração do líquido. Com o aumento da absorção da energia acústica, o tamanho das bolhas aumenta até atingir seu tamanho crítico e, conseqüentemente, ocorre uma implosão, liberando a energia absorvida e aquecendo a área circundante a uma alta temperatura

instantânea de aproximadamente 5500°C. Além da alta temperatura, a alta pressão, tensão de cisalhamento, turbulência e agitação são características distintas em todo o processamento ultrassônico (YU et al., 2017) (Figura 1).

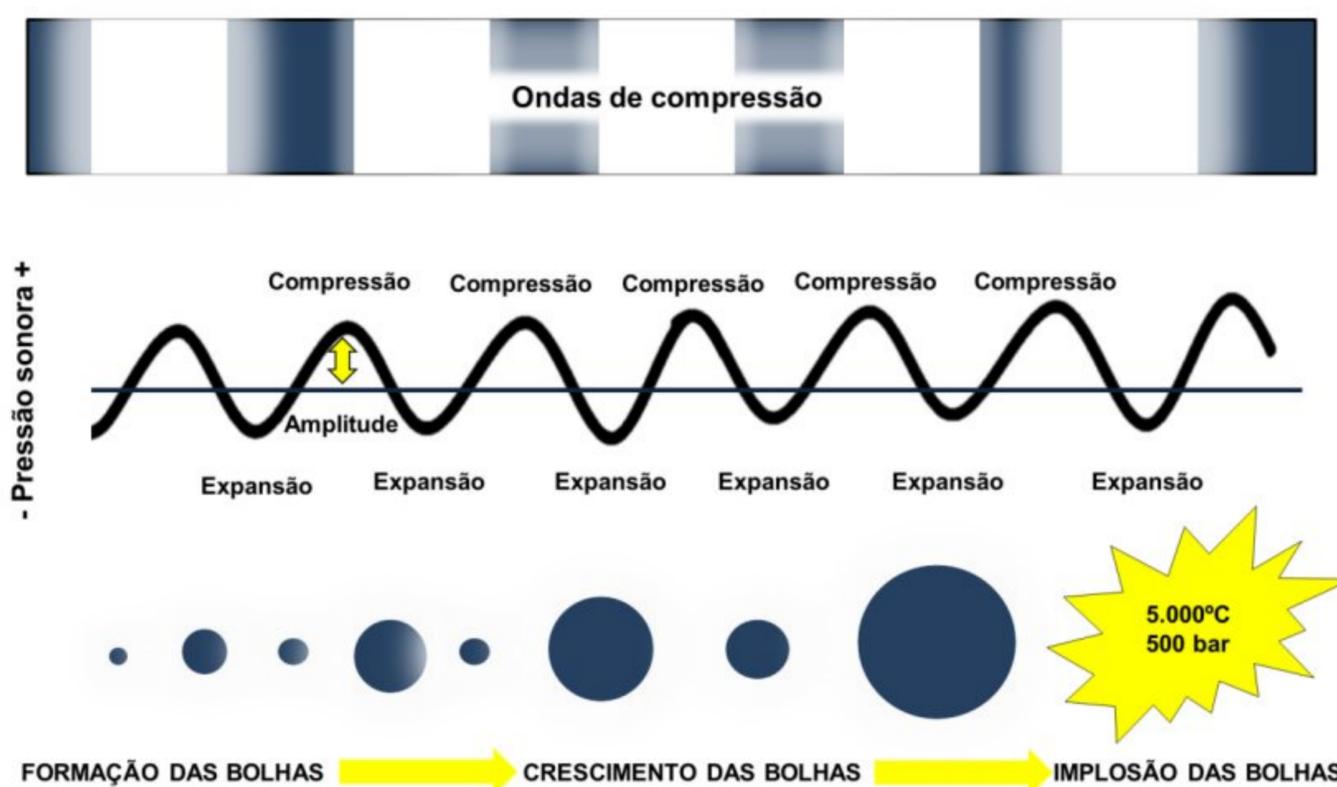


Figura 1 – Princípio da cavitação ultrassônica

Fonte: Ultrasonic Disintegration adaptada

Os efeitos das ondas ultrassônicas são de grande complexidade, podendo melhorar ou dificultar a ação hidrolítica das proteínas, e são dependentes de algumas condições de processo, como tipo e geometria do sistema, frequência, densidade de energia acústica e tempo, bem como da natureza da enzima (ULUKO et al., 2015; O'DONNELL et al., 2010). Na indústria de alimentos, o US pode ser aplicado de duas formas, pelo método direto (ultrassom tipo sonda) e indireto (ultrassom de banho). No método indireto, os transdutores são fixados na parte inferior do tanque e a energia ultrassônica é transmitida através de um líquido. Por outro lado, no método direto, a sonda ultrassônica é imersa na solução e fornece uma potência ultrassônica que é pelo menos 100 vezes maior que a fornecida pelo banho (GOULA et al., 2017; WELTI-CHANES et al., 2017) (Figura 2).

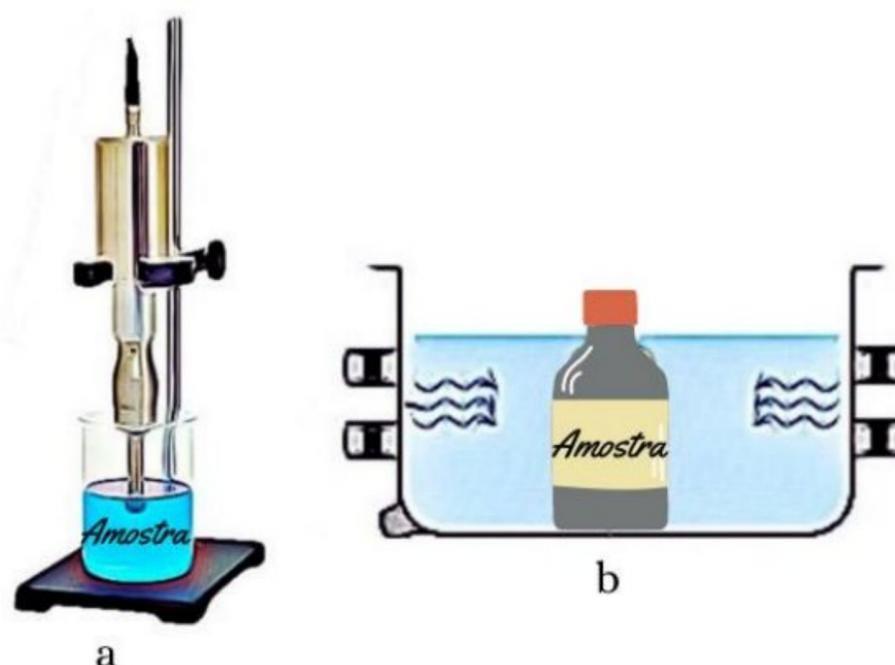


Figura 2 – Processo ultrassônico. (a) Método direto; (b) Método indireto.

Fonte: Autora (2023)

O US pode atuar em três vias em relação às reações enzimáticas: enzima, substrato e/ou na reação assistida (Wang et al., 2018). De forma geral, o processo ultrassônico com uma menor energia fornecida é mais favorável para melhorar a atividade enzimática, enquanto uma longa exposição pode provocar uma perda progressiva da estabilidade e atividade das enzimas (DELEGADO-POVEDANO; CASTRI, 2015).

Alguns estudos já demonstraram efeitos positivos do US de banho na melhoria da performance enzimática. Soares et al. (2020) avaliaram o efeito do ultrassom de banho (25 kHz, 22 W/L) como pré-tratamento da lipase, e observaram um aumento de 12% na atividade da enzima em condições específicas de processo (25° C/45 min e 40° C/60 min). Yu et al. (2013), demonstraram um aumento de 17,2% na atividade da tirosinase, após 150 minutos de tratamento em US de banho (40kHz, 31W/L, 25°C). Dalagnol et al. (2017) investigaram o efeito do ultrassom de banho (40kHz, 23W/L, 30°C) como pré-tratamento da celulose (10 min) e xilanase (5 min), e constataram um aumento de 17% e 25% na atividade da celulase e xilanase, respectivamente. Magalhães et al. (2022) analisaram a hidrólise enzimática assistida por ultrassom de banho (25 kHz/ 450 W) de caseína de leite de cabra e corroboraram que a reação assistida por ultrassom aumentou a taxa de hidrólise da caseína do leite de cabra em até 120%.

A influência da aplicação do US já foi estudada em algumas propriedades das proteínas de diferentes insetos, como propriedades gelificantes (KUMAR et al., 2022)

e propriedades de emulsificação (WANG et al., 2021). Em contrapartida, publicações sobre a aplicação do US para potencializar a hidrólise enzimática das proteínas são escassos, principalmente proteínas de grilo preto. O número de publicações científicas na base de dados *scopus* entre os anos de 2019 a 2022 é de apenas seis artigos, quando se utiliza as palavras-chaves “inseto”, “hidrólise” e “ultrassom”, traduzidas para a língua inglesa. Desses estudos, apenas três abordam diretamente o efeito do US na produção de hidrolisados.

Destes três estudos encontrados na literatura, Rivero-Pino et al. (2020) investigaram a influência do ultrassom de ponteira no pré-processamento da farinha de *Tenebrio molitor* seguida pela hidrólise enzimática com Alcalase® (subtilisina) e tripsina visando a produção de peptídeos inibidores da α -glucosidase. Os autores constataram que o pré-tratamento com ultrassom foi capaz de potencializar os peptídeos inibidores da α -glucosidase durante a hidrólise enzimática posterior. Os autores atribuíram os resultados a uma modificação do substrato causado pelo US que favoreceu o acesso enzimático, resultando em uma maior geração de compostos de interesse.

No segundo estudo, Mintah et al. (2020a) analisaram se o pré-tratamento de ultrassom (US de frequência múltipla com ciclo de varredura de 500 ms, tempo de pulso de 15 s ligado e 5 s desligado, potência de 600 W e frequência de 40 ± 2 kHz) iria influenciar nas características estruturais, físicas e funcionais de isolados e hidrolisados de proteína da mosca-soldado (*Hermetia illucens*). Os autores concluíram que os hidrolisados tratados com ultrassom exibiram alta fração de peptídeos de cadeia curta, sendo uma tecnologia viável para alterar a estrutura e melhorar os atributos funcionais e físicos.

No terceiro estudo, com o objetivo de determinar o efeito da sonicação de varredura e de frequência fixa como pré-tratamento de proteínas de mosca-soldado (*Hermetia illucens*) antes da hidrólise enzimática, Mintah et al. (2020b) utilizaram três tratamentos: convencional (sem US), US de varredura (ciclo de varredura de 500 ms, tempo de pulso de 15 s ligado e 5 s desligado, potência de 600 W e frequência de 40 ± 2 kHz) e US de frequência fixa (mesmas condições do US de varredura, mas com a frequência estável de 40 kHz). Após o processamento, realizaram análises de capacidade antioxidante, solubilidade, capacidade emulsionante e capacidade de formação de espuma da proteína nativa e dos hidrolisados e observaram que os hidrolisados tratados por US, particularmente com frequência de varredura,

mostraram melhor solubilidade, capacidade de formação de espuma e capacidade antioxidante.

Diante das informações expostas, pode-se observar que o US é uma tecnologia emergente capaz de potencializar a hidrólise enzimática, permitindo a obtenção de compostos com melhores propriedades tecno-funcionais e biológicas. Porém, apesar do grilo preto (*Gryllus assimilis*) ser um dos principais insetos criados no Brasil, não existe pesquisas relacionadas com aplicação do ultrassom para potencializar o processo de hidrólise enzimática. Além disso, apesar da simplicidade do equipamento e menor custo, o uso de ultrassom de banho para a finalidade de melhorar a obtenção de hidrolisados proteicos de insetos comestíveis não foi estudado, sendo necessário aumentar o volume de trabalhos disponíveis para garantir respostas mais conclusivas acerca de sua aplicabilidade industrial.

7. Referências

- ABBASI, Tasneem et al. Reduzindo o impacto ambiental global da produção pecuária: a opção minipequária. **Journal of Cleaner Production**, v. 112, p. 1754-1766, 2016.
- AHMADIFARD, Nasrollah et al. Comparison the effect of three commercial enzymes for enzymatic hydrolysis of two substrates (rice bran protein concentrate and soy-been protein) with SDS-PAGE. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, p. 1279-1284, 2016.
- AKHTAR, Yasmin; ISMAN, Murray B. Insects as an alternative protein source. In: **Proteins in food processing**. Woodhead Publishing, 2018. p. 263-288.
- ALUKO, Rotimi E. **Functional foods and nutraceuticals**. New York, NY, USA:: Springer, 2012.
- ANADUAKA, Emeka Godwin et al. Nutritional compositions of two edible insects: *Oryctes rhinoceros* larva and *Zonocerus variegatus*. **Heliyon**, v. 7, n. 3, p. e06531, 2021.
- ARAÚJO, R. R. S. et al. Nutritional composition of insects *Gryllus assimilis* and *Zophobas morio*: Potential foods harvested in Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 76, p. 22–26, 2019.
- BAIANO, A. Edible insects: An overview on nutritional characteristics, safety, farming, production technologies, regulatory framework, and socio-economic and ethical implications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 100, p. 35-50, 2020.
- BEDNÁŘOVÁ, M.; BORKOVCOVÁ, M.; KOMPRDA, T. Purine derivate content and amino acid profile in larval stages of three edible insects. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, p. 71–76, 2014.
- BOBBIO, Florinda O.; BOBBIO, Paulo A. Introdução à química de alimentos. In: **Introdução à química de alimentos**. 1989. p. [71].
- CHAKRAVORTY, J. et al. Nutritional and anti-nutritional composition of *Oecophylla smaragdina* (Hymenoptera: Formicidae) and *Odontotermes* sp. (Isoptera: Termitidae): Two preferred edible insects of Arunachal Pradesh, India. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 19, n. 3, p. 711-720, 2016.
- CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, Denise R. **Biochemistry**. Lippincott Williams & Wilkins, 2005.
- DAI, C. et al. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide derived from *Tenebrio molitor* (L.) larva protein hydrolysate. **European Food Research and Technology**, v. 236, n. 4, p. 681-689, 2013.
- DALAGNOL, L. M. G. et al. Improvement of pectinase, xylanase and cellulase activities by ultrasound: Effects on enzymes and substrates, kinetics and thermodynamic parameters. **Process Biochemistry**, v. 61, p. 80-87, 2017.
- DAVID-BIRMAN, T.; RAFTEN, G.; LESMES, U. Effects of thermal treatments on the colloidal properties, antioxidant capacity and in-vitro proteolytic degradation of cricket flour. **Food Hydrocolloids**, v. 79, p. 48-54, 2018.
- DE CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the

food and pharmaceutical industries. **Food Research International**, v. 74, p. 185-198, 2015

DE CASTRO, Ruann Janser Soares et al. Nutritional, functional and biological properties of insect proteins: Processes for obtaining, consumption and future challenges. **Trends in Food Science & Technology**, v. 76, p. 82-89, 2018.

DE MATOS, Francielle Miranda 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, p. 102276, 2022.

DELGADO-POVEDANO, M.; DE CASTRO, M. L. A review on enzyme and ultrasound: A controversial but fruitful relationship. **Analytica Chimica Acta**, v. 889, p. 1-21, 2015.

DION-POULIN, Alexandra et al. Functionality of cricket and mealworm hydrolysates generated after pretreatment of meals with high hydrostatic pressures. **Molecules**, v. 25, n. 22, p. 5366, 2020.

ESKOLA, M. et al. Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited 'FAO estimate' of 25%. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 60, n. 16, p. 2773-2789, 2020.

FAO. **A Situação Mundial da Pesca e Aquicultura 2020**. Sustentabilidade em ação. Roma. 2020.

FAO. **Edible insects: Future prospects for food and feed security**. Rome. Food and Agriculture Organization of the United Nations-FAO. 2013. 2013

FATHOLLAHY, Isa et al. Characteristics and functional properties of Persian lime (*Citrus latifolia*) seed protein isolate and enzymatic hydrolysates. **LWT**, v. 140, p. 110765, 2021.

FENG, Y. et al. Edible insects in China: Utilization and prospects. **Insect Science**, v. 25, n. 2, p. 184-198, 2018.

FONSECA, R. A. D. S. **Atividade antioxidante de peptídeos provenientes de hidrolisado proteico de bijupirá (*rachycentron canadum*)**. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência dos Alimentos) – Escola de química e alimentos, Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande do Sul. 2014.

GHOSH, S. et al. Nutritional composition of five commercial edible insects in South Korea. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 20, n. 2, p. 686-694, 2017.

GJERRIS, Mickey; GAMBORG, Christian; RÖCKLINSBERG, Helena. Ethical aspects of insect production for food and feed. **Journal of Insects as Food and Feed**, v. 2, n. 2, p. 101-110, 2016.

GOULA, A. M.; VERVERI, M.; ADAMOPOULOU, A.; KADERIDES, K. Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids from pomegranate wastes using vegetable oils. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 821-830, 2017.

GROSSMANN, Lutz; MCCLEMENTS, David Julian. Current insights into protein solubility: A review of its importance for alternative proteins. **Food Hydrocolloids**, p. 108416, 2022.

HALL, F.; JOHNSON, P. E.; LICEAGA, A. Effect of enzymatic hydrolysis on bioactive properties and allergenicity of cricket (*Grylodes sigillatus*) protein. **Food chemistry**, v. 262, p. 39-47, 2018.

HAQUE, M. A.; TIMILSENA, Y. P.; ADHIKARI, B. Food proteins, structure, and function. **Reference Module in Food Science; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands**, p. 1-8, 2016.

HELLEBOIS, Thierry et al. Impact of heat treatment on the acid induced gelation of brewers' spent grain protein isolate. **Food Hydrocolloids**, v. 113, p. 106531, 2021.

IMATHIU, S. Benefits and food safety concerns associated with consumption of edible insects. **NFS Journal**, v. 18, p. 1-11, 2020.

KILARA, Arun; PANYAM, Dinakar. Peptides from milk proteins and their properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, n. 6, p. 607-633, 2003.

KIM, Hyun-Wook et al. Pre-treated mealworm larvae and silkworm pupae as a novel protein ingredient in emulsion sausages. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 38, p. 116-123, 2016.

KUMAR, Sruthi et al. Gelling properties of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae protein after ultrasound treatment. **Food Chemistry**, v. 386, p. 132826, 2022.

LIANG, Guijiang et al. Modification of soy protein isolates using combined pre-heat treatment and controlled enzymatic hydrolysis for improving foaming properties. **Food Hydrocolloids**, v. 105, p. 105764, 2020.

LICEAGA, A. Edible insects, a valuable protein source from ancient to modern times. **Advances in Food and Nutrition Research**, 2022.

LICEAGA, Andrea M. et al. Insects as an alternative protein source. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 13, p. 19-34, 2022.

LI-CHAN, E. C. Bioactive peptides and protein hydrolysates: research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients. **Current Opinion in Food Science**, v. 1, p. 28-37, 2015.

LIU, Y. et al. Antioxidant activity and stability study of peptides from enzymatically hydrolyzed male silkworm. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, n. 1, p. e13081, 2017.

MACHADO, Carolina da Rosa; THYS, Roberta Cruz Silveira. Cricket powder (*Gryllus assimilis*) as a new alternative protein source for gluten-free breads. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 56, p. 102180, 2019.

MAJID, A.; PRIYADARSHINI, P. C. J. Millet derived bioactive peptides : A review on their functional properties and health benefits. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1–10, 2019.

MANDITSERA, F. A. et al. Effect of domestic cooking methods on protein digestibility and mineral bioaccessibility of wild harvested adult edible insects. **Food Research International**, v. 121, p. 404–411, 2019.

MARCINIAK, A. et al. Enhancing enzymatic hydrolysis of food proteins and production of bioactive peptides using high hydrostatic pressure technology. **Trends in Food Science & Technology**, v. 80, p. 187-198, 2018.

MINTAH, B. K. et al. Characterization of edible soldier fly protein and hydrolysate altered by multiple-frequency ultrasound: Structural, physical, and functional attributes. **Process Biochemistry**, v. 95, p. 157-165, 2020.

MINTAH, B. K. et al. Techno-functional attribute and antioxidative capacity of edible insect protein preparations and hydrolysates thereof: Effect of multiple mode sonochemical action. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 58, p. 104676, 2019.

MONTIEL-AGUILAR, L. J. et al. Nutraceutical effects of bioactive peptides obtained from *Pterophylla beltrani* (Bolivar & Bolivar) protein isolates. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 23, n. 3, p. 756-761, 2020.

MONTOWSKA, M. et al. Nutritional value, protein and peptide composition of edible cricket powders. **Food Chemistry**, v. 289, p. 130–138, 2019.

MÜLLER, Andrew et al. Entomophagy and power. **Journal of Insects as Food and Feed**, v. 2, n. 2, p. 121-136, 2016.

NGOH, Ying-Yuan; GAN, Chee-Yuen. Enzyme-assisted extraction and identification of antioxidative and α -amylase inhibitory peptides from Pinto beans (*Phaseolus vulgaris* cv. Pinto). **Food Chemistry**, v. 190, p. 331-337, 2016.

NONGONIERMA, A. B.; FITZGERALD, R. J. Unlocking the biological potential of proteins from edible insects through enzymatic hydrolysis: A review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 43, p. 239–252, 2017.

NONGONIERMA, A. B.; FITZGERALD, R. J. Unlocking the biological potential of proteins from edible insects through enzymatic hydrolysis: A review. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 43, p. 239-252, 2017.

O'DONNELL, C. P. et al. Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance. **Trends in food science & technology**, v. 21, n. 7, p. 358-367, 2010.

OIBIOKPA, F. I. et al. Nutrient and antinutrient compositions of some edible insect species in Northern Nigeria. **Fountain Journal of Natural and Applied Sciences**, v. 6, n. 1, 2017.

OIBIOKPA, F. I. et al. Protein quality of four indigenous edible insect species in Nigeria. **Food Science and Human Wellness**, v. 7, n. 2, p. 175-183, 2018.

OJHA, S. et al. Edible insect processing pathways and implementation of emerging technologies. **Journal of Insects as Food and Feed**, v. 7, n. 5, p. 877-900, 2021.

PAYNE, C. L. et al. A systematic review of nutrient composition data available for twelve commercially available edible insects, and comparison with reference values. **Trends in Food Science & Technology**, v. 47, p. 69-77, 2016.

PURSCHKE, B. et al. Improvement of techno-functional properties of edible insect protein from migratory locust by enzymatic hydrolysis. **European Food Research and Technology**, v. 244, n. 6, p. 999-1013, 2018.

RIVERO-PINO, F. et al. Effect of ultrasound pretreatment and sequential hydrolysis on the production of *Tenebrio molitor* antidiabetic peptides. **Food and Bioprocess Processing**, v. 123, p. 217-224, 2020.

RODRIGUES, G. Altamente proteicos, insetos começam a entrar no cardápio. **O Tempo**, 2019.

RUMPOLD, B. A.; SCHLÜTER, O. K. Potential and challenges of insects as an innovative source for food and feed production. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 17, p. 1-11, 2013.

SOARES, Ariana de Souza et al. Effect of ultrasound on goat cream hydrolysis by lipase: Evaluation on enzyme, substrate and assisted reaction. **LWT**, v. 130, p. 109636, 2020.

SOARES, Ariana de Souza et al. Ultrasound assisted enzymatic hydrolysis of sucrose catalyzed by invertase: Investigation on substrate, enzyme and kinetics parameters. **Lwt**, v. 107, p. 164-170, 2019.

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

TACIAS-PASCACIO, Veymar G. et al. Use of Alcalase in the production of bioactive peptides: A review. **International journal of biological macromolecules**, v. 165, p. 2143-2196, 2020.

TACO. TACO- TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS. NEPA-UNICAMP. 4: 161-319 p. 2011.

TAO, J.; LI, Y. O. Edible insects as a means to address global malnutrition and food insecurity issues. **Food Quality and Safety**, v. 2, n. 1, p. 17-26, 2018.

TOLDRÁ, Fidel et al. Generation of bioactive peptides during food processing. **Food Chemistry**, v. 267, p. 395-404, 2018.

TOLDRÁ, Fidel et al. Recent progress in enzymatic release of peptides in foods of animal origin and assessment of bioactivity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 46, p. 12842-12855, 2020.

Translocase Introduction. **Creative enzymes**, 2023. Disponível em: https://www.creative-enzymes.com/resource/translocase-introduction_42.html.

Acesso em: 01 de fevereiro de 2023

UDENIGWE, C. C.; ALUKO, R. E. Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. **Journal of food science**, v. 77, n. 1, p. R11-R24, 2012.

VAN HUIS, A. et al. How many people on our planet eat insects: 2 billion?. **Journal of Insects as Food and Feed**, v. 8, n. 1, p. 1-4, 2022.

VERCRUYSSSE, L. et al. Antioxidative and ACE inhibitory activities in enzymatic hydrolysates of the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. **Food Chemistry**, v. 114, n. 1, p. 38-43, 2009.

WANG, Danli et al. Ultrasound promotes enzymatic reactions by acting on different targets: Enzymes, substrates and enzymatic reaction systems. **International journal of biological macromolecules**, v. 119, p. 453-461, 2018.

WANG, Shuya et al. Effect of ultrasonic pretreatment on the emulsification properties of *Clanis bilineata tingtauca* Mell protein. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 80, p. 105823, 2021.

WELTI-CHANES, Jorge et al. Opportunities and challenges of ultrasound for food processing: An industry point of view. **Ultrasound: Advances for food processing and preservation**, p. 457-497, 2017.

YAN, J. et al. Bioactive peptides with antidiabetic properties : a review. **International Journal of Food Science and Technology**, p. 1–11, 2019.

YEN, Alan L. Insects as food and feed in the Asia Pacific region: current perspectives and future directions. **Journal of Insects as Food and Feed**, v. 1, n. 1, p. 33-55, 2015.

YOUSEFI, Negin; ABBASI, Soleiman. Food Proteins: Solubility & Thermal Stability Improvement Techniques. **Food Chemistry Advances**, p. 100090, 2022.

YU, H. et al. Effects of high-intensity ultrasound on Maillard reaction in a model system of d-xylose and l-lysine. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 154-163, 2017.

YU, Zhi-Long; ZENG, Wei-Cai; LU, Xiao-Li. Influence of ultrasound to the activity of tyrosinase. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 20, n. 3, p. 805-809, 2013.

YUST, María M. et al. Production of ace inhibitory peptides by digestion of chickpea legumin with alcalase. **Food Chemistry**, v. 81, n. 3, p. 363-369, 2003.

ZHANG, Liqiong et al. Effects of sequential enzymatic hydrolysis and transglutaminase crosslinking on functional, rheological, and structural properties of whey protein isolate. **LWT**, v. 153, p. 112415, 2022.

ZHONG, Fang et al. Fractionation and identification of a novel hypocholesterolemic peptide derived from soy protein Alcalase hydrolysates. **Food Research International**, v. 40, n. 6, p. 756-762, 2007.

CAPÍTULO 2

Hidrólise da proteína do grilo preto (*Gryllus assimilis*) potencializada por ultrassom: efeito na cinética de hidrólise, solubilidade e atividade antioxidante

HIDRÓLISE DA PROTEÍNA DO GRILO PRETO (*Gryllus assimilis*) POTENCIALIZADA POR ULTRASSOM: EFEITO NA CINÉTICA DE HIDRÓLISE, SOLUBILIDADE E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Resumo

Este estudo avaliou os efeitos do ultrassom (US) na hidrólise enzimática da proteína de grilo preto (PGP) e os hidrolisados obtidos com relação à solubilidade e atividade antioxidante *in vitro*. Aumento na atividade enzimática relativa ($p < 0,05$) foi obtido após aplicação do US (23,8 W/L, 40 kHz) na enzima Alcalase® (até 59,4 % após 30 min/ 25 °C) e na PGP (até 148,5 % após 30 min/ 40 °C). As hidrólises da PGP sob condições potencializadas e assistida por US proporcionaram um aumento de até 227 % na taxa de proteólise e até 52,2 % no grau de hidrólise final, em comparação com a reação convencional. Conseqüentemente, os hidrolisados obtidos com a intervenção do US apresentaram melhor capacidade antioxidante (47,8 % para DPPH e 113,6 % para ABTS) e solubilidade (9,7 %) em relação a hidrólise convencional. Em conclusão, observa-se que a PGP pré-sonicada ou a hidrólise assistida por US são boas estratégias para potencializar a geração de hidrolisados proteicos com melhores propriedades biológicas e funcionais.

Termos para indexação: grau de hidrólise, inseto comestível, propriedades biológicas, propriedades técnico-funcionais, solubilidade proteica, sonicação.

PROTEIN HYDROLYSIS OF THE BLACK CRICKET (*Gryllus assimilis*) ENHANCED BY ULTRASOUND: EFFECT ON HYDROLYSIS KINETICS, SOLUBILITY AND ANTIOXIDANT ACTIVITY

Abstract

This study evaluated the effects of ultrasound (US) on the enzymatic hydrolysis of black cricket protein (BCP), and the effects on the solubility and *in vitro* antioxidant activity of the obtained hydrolysates. An increase in relative enzymatic activity ($p < 0.05$) was obtained after the application of US (23.8 W/L, 40 kHz) on Alcalase® (up to 59.4% after 30 min/25 °C) and on PGP (up to 148.5% after 30 min/40 °C). Hydrolysis of pre-sonicated PGP under potentiated conditions or using US-assisted reaction provided up to 227% increase in the proteolysis rate and up to 52.2% increase in the final hydrolysis degree, compared to the conventional reaction. Consequently, the hydrolysates obtained with the US intervention showed better antioxidant capacity (47.8% for DPPH and 113.6% for ABTS) and solubility (9.7%) compared to conventional hydrolysis. In conclusion, it is observed that pre-sonicated PGP or US-assisted hydrolysis are interesting strategies to enhance the hydrolysates obtaining and to improve their biological and functional properties.

Index terms: degree of hydrolysis, edible insect, biological properties, techno-functional properties, protein solubility, sonication.

1. INTRODUÇÃO

O consumo de insetos como fonte proteica tem sido apontado como uma importante alternativa para garantir a segurança alimentar da crescente população mundial (FAO, 2020) de forma sustentável e economicamente viável (Lange & Nakamura, 2020). Os insetos são ricos nutricionalmente, sendo fonte de proteínas, lipídios, fibras, vitaminas e minerais (Roncolini et al., 2020). Os principais insetos produzidos no Brasil são o grilo preto (*Gryllus assimilis*) e o tenébrio gigante (*Zophobas morio*) (Araújo et al., 2019). O grilo preto apresenta em base seca 63 % de proteína, 21% de lipídios, 8 % de fibras alimentares, 3 % de cinzas e 10 % de umidade (Machado & Thys, 2019). Além do seu valor nutricional, as proteínas de insetos apresentam potencial para produção de peptídeos com propriedades biológicas e técnico-funcionais, como atividade antioxidante, antidiabética, anti-hipertensiva e melhoria na solubilidade, capacidade de retenção de água e óleo, emulsificação e capacidade de formação de espuma (De Matos et al., 2022; Dion-Poulin et al., 2020; Kim et al., 2016; Mintah et al., 2019; Montiel-Aguilar et al., 2020; Purschke et al., 2018). Porém, para exercer essas propriedades, a proteína nativa deve ser hidrolisada (Ulug et al., 2021).

Os peptídeos bioativos podem ser obtidos pela hidrólise enzimática, sendo uma importante estratégia para aumentar a aceitação dos insetos comestíveis enquanto ingrediente alimentício, bem como permitir a obtenção de compostos com melhores propriedades biológicas e técnico-funcionais (Nongonierma & Fitzgerald, 2017). Em comparação à outras proteases usadas no processo de hidrólise enzimática, a Alcalase® tem se destacado como uma das melhores enzimas comerciais para promover a liberação de peptídeos bioativos, devido a sua alta atividade proteolítica com especificidade sobre as ligações peptídicas contendo resíduos hidrofóbicos com grupos carboxila Phe, Tyr, Trp e Lys (Tacias-Pascacio et al., 2020; Whang et al., 2021).

Ainda assim, o processo de hidrólise enzimática envolve algumas desvantagens, como o alto custo das enzimas, longo tempo de hidrólise e baixo rendimento (Ulug et al., 2021). Portanto, novas estratégias têm sido adotadas para melhorar a estabilidade e a performance de enzimas visando potencializar as reações enzimáticas. Entre estas estratégias está a aplicação de ultrassom (US), processo no qual a cavitação acústica gerada pode promover mudanças conformacionais na

estrutura da enzima e da proteína, bem como acelerar o processo de hidrólise nas reações assistidas por US (Soares et al., 2019; Soares et al., 2020).

Alguns estudos já revelaram que o US pode melhorar as propriedades biológicas e funcionais de hidrolisados de proteína de insetos. Rivero-Pino et al. (2020) relataram que o pré-processamento da farinha de *Tenebrio molitor* seguida pela hidrólise enzimática com Alcalase® e tripsina potencializaram a produção de peptídeos inibidores da α -glucosidase. Além disso, Mintah et al. (2020) concluíram que os hidrolisados de proteína da mosca-soldado (*Hermetia illucens*) tratados com ultrassom exibiram alta fração de peptídeos de cadeia curta, sendo uma tecnologia viável para alterar a estrutura da proteína nativa e melhorar os atributos funcionais e físicos a partir dos hidrolisados obtidos.

Embora já tenha sido comprovado que o US tenha potencial para potencializar a hidrólise enzimática, não existem estudos na literatura que avaliaram o efeito desta tecnologia na produção de hidrolisados proteicos de grilo preto. Além disso, a maioria dos trabalhos publicados envolvendo hidrólise enzimática utilizaram o sonicador de ponteira, que apresenta maior custo inicial e de manutenção em comparação com o ultrassom de banho, e não avaliaram o seu efeito sobre enzima, substrato e reação assistida simultaneamente, o que dificulta a interpretação de qual seria a melhor estratégia para sua aplicação.

O presente estudo foi realizado para avaliar os efeitos do ultrassom de banho na hidrólise enzimática da proteína de grilo preto (PGP) após pré-tratamento da Alcalase®, da PGP e na reação assistida, além de investigar o impacto na solubilidade e atividade antioxidante *in vitro* dos hidrolisados obtidos em condições potencializadas por US.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A Figura 1 mostra a representação esquemática do estudo, envolvendo: (i) determinação da temperatura ótima da Alcalase® (seção 2.2), (ii) avaliação da atividade enzimática após pré-tratamento ultrassônico da enzima e da PGP em diferentes tempos e temperaturas (seção 2.3), (iii) cinética de hidrólise utilizando enzima e substrato pré-tratado por US em condições potencializadas, além da proteólise assistida por US (seção 2.4) e (iv) avaliação da solubilidade e atividade

antioxidante *in vitro* dos hidrolisados obtidos (seção 2.5). Informações detalhadas são apresentadas nas seções a seguir.

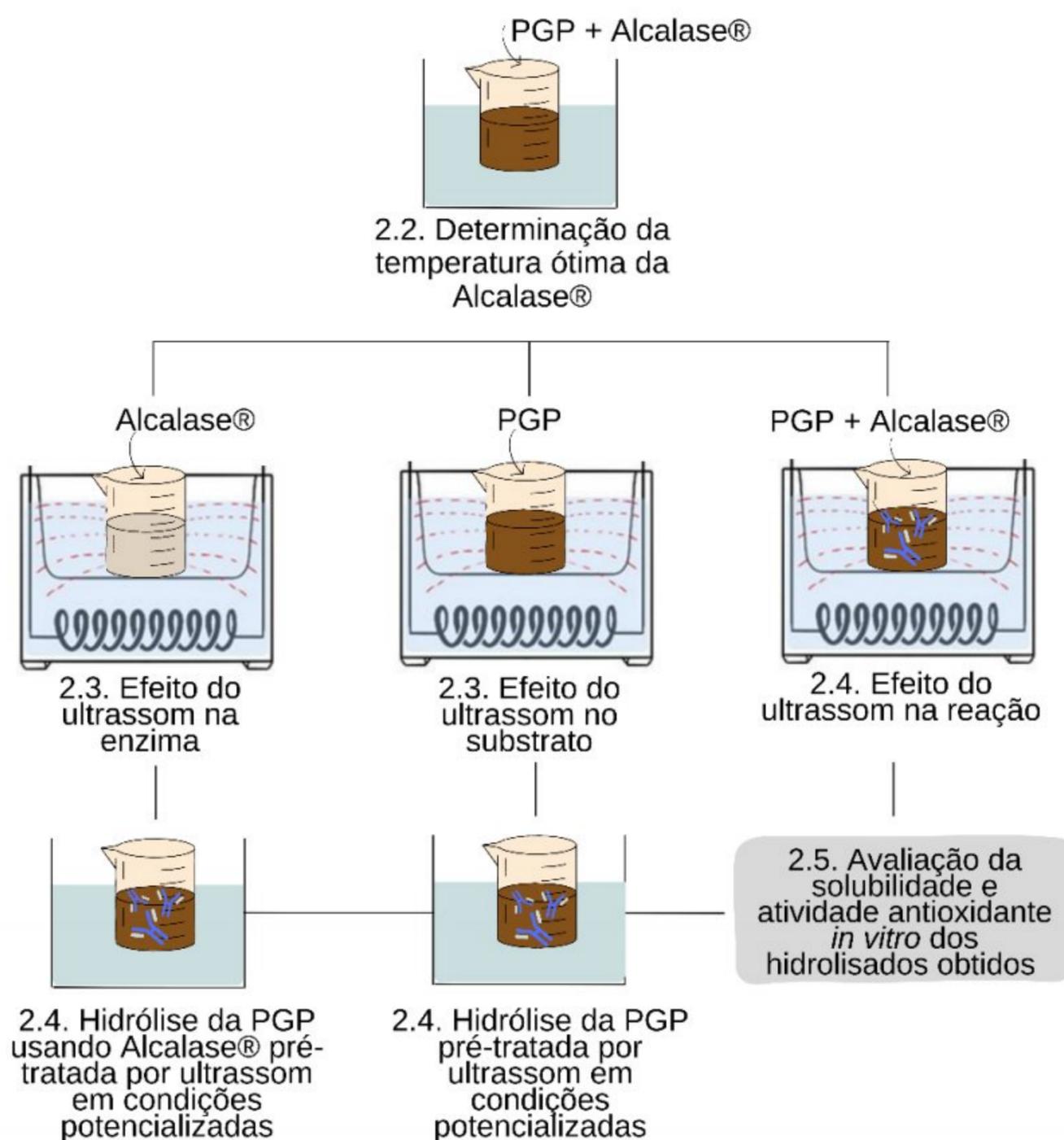


Figura 1. Desenho experimental do estudo

2.1 Obtenção da enzima e proteína de grilo preto (*Gryllus assimilis*) (PGP)

A protease usada no estudo foi a Alcalase® (*Bacillus licheniformis*), doada pela Novozymes Latino Americana Ltda (Paraná, Brasil). Os grilos pretos (*Gryllus assimilis*) foram gentilmente doados pela biofábrica Hakkuna, localizada na cidade de Piracicaba (São Paulo, Brasil). Esses insetos foram desidratados em estufas com circulação forçada de ar (50 °C/4 horas) até atingirem 10 % de umidade. Posteriormente, foram triturados com o objetivo de produzir uma farinha com elevado teor proteico (61 % em matéria seca) para ser usada neste estudo como substrato (PGP).

2.2 Determinação da atividade da Alcalase® em proteína de grilo preto (*Gryllus assimilis*) em diferentes temperaturas

A temperatura ótima da Alcalase® usando como substrato a PGP foi determinada seguindo a metodologia descrita por Leite Júnior et al. (2014) em temperaturas de 25, 35, 45, 50, 55, 60, 65 e 70 °C. Para isso, 0,7 g da PGP (0,7 % p/v) foi disperso, sob agitação durante 1 hora, em 100 mL de solução tampão fosfato de sódio (0,1 M) com pH 7,5. Após esse período, a amostra foi mantida em banho termostático até equilibrar a temperatura e, em seguida, uma alíquota de 1 mL da solução enzimática (0,7 % v/v, concentrações definidas com base em valores de Km e dentro da faixa de diluição recomendada pelos fabricantes) foi adicionada e a hidrólise enzimática ocorreu por um período de 30 minutos.

Posteriormente, 1 mL do hidrolisado foi coletado e adicionado a 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) (20 % p/v) para paralisar a reação. A solução foi centrifugada a 7500 g por 15 min a 4 °C, e o sobrenadante foi separado para análise espectrofotométrica de luz UV a uma absorvância de 280 nm. Um controle foi preparado, em que o TCA foi adicionado antes da solução enzimática e o $\Delta\text{Abs } 280 \text{ nm}$ foi determinado a partir da diferença da absorvância entre a amostra e o branco. A temperatura ótima foi definida de acordo com a condição que apresentou maior atividade enzimática (100 % da atividade enzimática). Para o cálculo da atividade enzimática relativa (AER) nas demais condições foi utilizada a equação 1 (Eq. 1).

$$AER(\%) = \left(\frac{\text{atividade na condição não ótima}}{\text{condição ótima de atividade}} \right) \cdot 100 \quad \text{Eq. 1}$$

2.3 Efeito do pré-tratamento por ultrassom sobre a proteína de grilo preto (*Gryllus assimilis*) e Alcalase®: Avaliação da atividade enzimática

Para condução do experimento, foi utilizado um banho ultrassônico (Unique, modelo USC 2800 A, Indaiatuba, Brasil) com controle de temperatura, capacidade nominal de 9,5 L, dimensões internas de 300 × 240 × 150 mm, equipado com cinco transdutores de 40 kHz dispostos abaixo da cuba, potência nominal de 450 W e potência volumétrica de 23,8 W/L, medida de acordo com o método calorimétrico (O'Donnell et al., 2010). Inicialmente, o banho de US foi preenchido com um volume

de 6,5 L de água destilada e os processos foram realizados separadamente para a enzima e para o substrato, com o objetivo de avaliar o efeito do pré-processamento por US sobre cada componente (enzima e substrato) isoladamente.

Para isso, um béquer de vidro contendo a amostra (enzima ou substrato preparados conforme descrito na seção 2.2) foi posicionado no ponto de exposição máxima à intensidade ultrassônica e os pré-tratamentos foram realizados nas temperaturas de 25 °C (temperatura ambiente), 40 °C (temperatura intermediária) e 60 °C (temperatura determinada como ótima da enzima). Após 15, 30, 60, 90, 120 e 180 minutos de tratamento, alíquotas foram coletadas e a atividade enzimática relativa foi calculada considerando a atividade das amostras processadas por ultrassom em relação às não processadas, na mesma condição de temperatura, de acordo com a Eq. 2.

$$AER_E \text{ or } AER_S(\%) = \left(\frac{\text{atividade da amostra processada no US}}{\text{atividade da amostra sem processar}} \right) \cdot 100 \quad \text{Eq. 2}$$

Posteriormente, foram selecionadas as condições (temperatura e tempo de sonicação) que apresentaram maiores atividade enzimática relativa após pré-processamento da PGP (AER_S) e Alcalase® (AER_E).

2.4 Avaliação da cinética de hidrólise da proteína do grilo preto (*Gryllus assimilis*) usando enzima e substrato pré-tratados com US em condições potencializadas e sob reação assistida

2.4.1 Hidrólise da PGP usando substrato e enzima pré-tratados por US em condições potencializadas

Para analisar a hidrólise da PGP após o pré-tratamento ultrassônico do substrato e da enzima, 100 mL de solução proteica (preparada conforme descrito na seção 2.2) foi sonicada (conforme metodologia descrita na seção 2.3) em condição de maior AER_S (30 min a 40 °C). Paralelamente, 100 mL de solução enzimática (preparada conforme descrito na seção 2.2) foi sonicada em condição de maior AER_E (30 min a 25 °C).

Posteriormente, enzima e substrato sonicados foram utilizados separadamente para avaliar o efeito destes pré-tratamentos na cinética de hidrólise da PGP. Para isso,

enzima foi adicionada ao substrato (razão de 1 % v/v conforme condição definida na seção 2.2) e a hidrólise foi realizada a 60 °C, 40 °C ou 25 °C durante 180 min. Como controle, amostras não tratadas por US foram hidrolisadas nas mesmas condições. A hidrólise foi avaliada por meio do grau de hidrólise (GH).

2.4.2 Hidrólise da PGP assistida por ultrassom

Para avaliar a cinética de hidrólise da PGP assistida por US nas temperaturas de 25 °C, 40 °C e 60 °C, um béquer contendo o substrato (solução de PGP 0,7 % p/v preparada conforme seção 2.2) foi adicionado ao banho de US no ponto de exposição máxima à intensidade ultrassônica (conforme metodologia descrita na seção 2.3). Após equilibrar a temperatura, a hidrólise foi iniciada com a adição da enzima previamente preparada conforme seção 2.2 em uma razão de 1 % v/v conforme condição definida na seção 2.2. O tempo de reação foi de 180 min e a hidrólise foi avaliada por meio do grau de hidrólise (GH).

2.4.3 Determinação do grau de hidrólise (GH)

O grau de hidrólise (GH) foi determinado pela metodologia pH-stat, conforme proposto por Adler-Nissen (1986), nas temperaturas de 25 °C, 40 °C e 60 °C. Para essa finalidade, a solução enzimática e a solução de PGP foram preparadas em água destilada, e o pH inicial foi ajustado para 7,5. As reações foram iniciadas conforme os itens 2.4.1 e 2.4.2 e o pH foi mantido estático (7,5) durante os 180 min de hidrólise nas respectivas temperaturas, pela adição de NaOH (0,1 M).

O GH foi descrito como a razão percentual entre o número de ligações peptídicas quebradas (h) e o número total de ligações peptídicas no substrato (h_{tot}), calculado de acordo com a Equação 3:

$$GH (\%) = \frac{h}{h_{tot}} \cdot 100 = \frac{V \cdot C}{\alpha \cdot M \cdot h_{tot}} \cdot 100 \quad Eq. 3$$

Onde, V (mL) é o volume de NaOH consumido durante a reação, C (mol/L) é a concentração de NaOH, α é o grau de dissociação dos grupos amino α -NH₂ liberados durante a reação em temperatura e pH específico (0,414 para Alcalase®, calculado de acordo com Kurozawa et al. (2009)), M (g) é a massa de proteína a ser hidrolisada e h_{tot} (mmol/g) é o número molar de ligações peptídicas por unidade de massa de proteína.

2.4.4 Modelagem da cinética da hidrólise da proteína de grilo preto (*Gryllus assimilis*)

A cinética da hidrólise foi avaliada por meio de um modelo cinético de primeira ordem, onde a velocidade da reação foi expressa pelo aumento da GH, conforme a Equação 4:

$$GH_t = GH_{\infty}(1 - e^{-kt}) \quad Eq. 4$$

Where:

GH_t = Grau de hidrólise (%) no tempo t ;

GH_{∞} = Grau final de hidrólise (%)

t = tempo de reação enzimática (min);

k = taxa de reação de hidrólise (min^{-1}) a uma determinada temperatura, que representa a hidrólise da proteína do grilo preto (*Gryllus assimilis*) quantificada pelo GH.

2.5 Avaliação da solubilidade e atividade antioxidante *in vitro*

A solubilidade e a atividade antioxidante foram determinadas nos hidrolisados obtidos nas condições descritas nas seções 2.4.1 e 2.4.2. Nos tempos 30, 60 e 180 min de hidrólise, a 60 °C, alíquotas foram coletadas, fervidas por 10 min para interromper a reação, e centrifugadas a 7500 g por 15 min a 4 °C para obter o sobrenadante. Como controle, a hidrólise convencional foi realizada em banho-maria nas mesmas condições, e alíquotas também foram coletadas ao mesmo tempo durante a hidrólise. Além disso, a proteína nativa (não hidrolisada) também foi avaliada.

A solubilidade dos hidrolisado e da proteína nativa foi determinada em valores de pH variando de 2,0 a 10,0 com intervalo de 2,0, conforme Magalhães et al. (2022). A atividade antioxidante *in vitro* foi medida por dois ensaios, sendo, atividades de eliminação de radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) conforme metodologia descrita por Magalhães et al. (2022).

2.6 Desenho experimental e análise estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com três repetições independentes, e as análises foram realizadas em triplicata para

cada repetição de processamento ($n = 9$). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Os parâmetros de cada modelo matemático (GH^∞ e parâmetro k) foram determinados por regressão não linear usando o software Curve Expert Professional (versão 2.6.5, Hyams Development, Chattanooga, EUA) em um nível de significância de 95 %. Os dados de AER, solubilidade e atividade antioxidante *in vitro* foram analisados por ANOVA one-way seguido pelo teste post hoc de Tukey para comparações múltiplas a 95 % de probabilidade (Statistical Analysis System - SAS Institute, Cary, NC, EUA; versão 9.2).

3. RESULTADOS

3.1. Atividade da Alcalase® em proteína de grilo preto (*Gryllus assimilis*) em diferentes temperaturas

A Figura 2 mostra a atividade da Alcalase® na hidrólise da PGP em pH 7,5 e diferentes temperaturas. Os resultados mostraram que a atividade máxima (280,4 e 244,1 U.mL^{-1}) foi obtida nas temperaturas de 60 °C e 65 °C, respectivamente ($p > 0,05$), sendo escolhida a temperatura de 60 °C como a ideal para realizar as demais etapas do trabalho, uma vez que trabalhar em temperaturas menores representa economia de energia de processos em larga escala. A avaliação da AER nas condições não ótimas mostrou que o aumento de temperatura para 70 °C causou abrupta queda de atividade (redução de 73 % - Figura 2), sugerindo desnaturação térmica da enzima, enquanto que a redução da temperatura resultou em gradativa diminuição do AER, atingindo valores similares ($p > 0.05$) ao observada a 70 °C em temperatura de 40 °C ou inferiores.

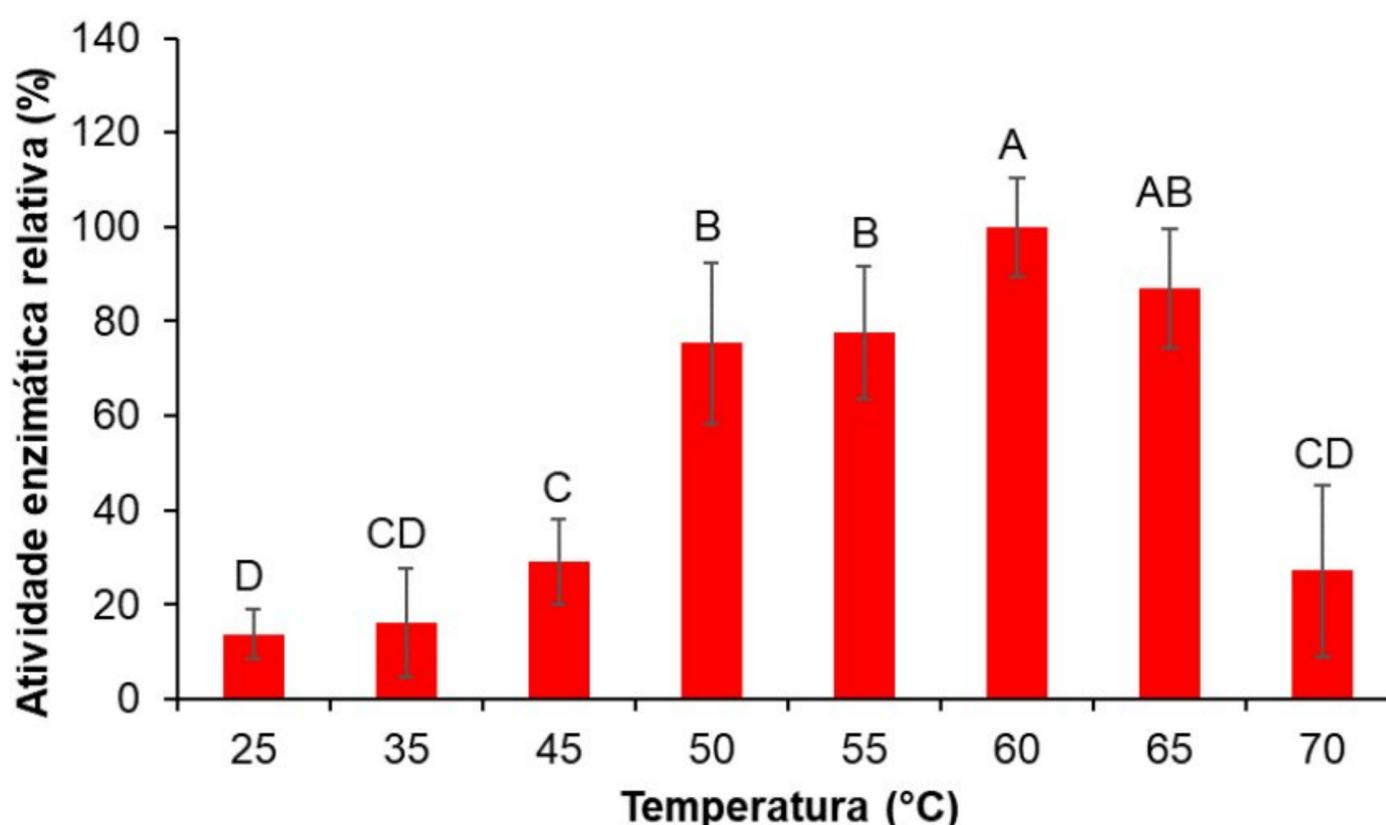


Figura 2. Efeito da temperatura na atividade enzimática relativa (AER) da Alcalase® em proteína de grilo preto (*Gryllus assimilis*). As barras verticais representam o desvio padrão. A condição de temperatura com maior atividade foi estabelecida como ótima, com 100 % da atividade da enzima. A atividade enzimática relativa (AER) foi calculada usando a Eq. (1) para todos os outros valores de temperatura. *Letras diferentes entre as amostras indicam diferenças significativas a 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.*

3.2. Efeito do ultrassom na Alcalase® e na proteína de grilo preto (*Gryllus assimilis*): Avaliação da atividade enzimática

A Figura 3 apresenta a atividade enzimática relativa medida em condições ótimas (60 °C / pH 7,5) e usando enzima (AER_E) e PGP (AER_S) pré-tratados por US à 25 °C, 40 °C e 60°C por até 180 min. Os resultados mostram que em algumas condições de processamento o ultrassom aplicado sobre enzima (15 e 30 min a 25 °C e 30 min a 40 °C) ou sobre o substrato (todos os tempos a 40 °C e após 30 min a 60 °C) foram capazes de aumentar a AER ($p < 0,05$). No caso da enzima processada, o maior aumento (59,4 %) foi observado após pré-tratamento a 25 °C/ 30 min. Já para o substrato, aumento máximo de 148,5 % foi observado após pré-processamento a 40 °C/ 30 min. Estas condições, portanto, foram estabelecidas como as melhores para pré-processar enzima e PGP por ultrassom visando aumentar a eficiência da hidrólise do substrato.

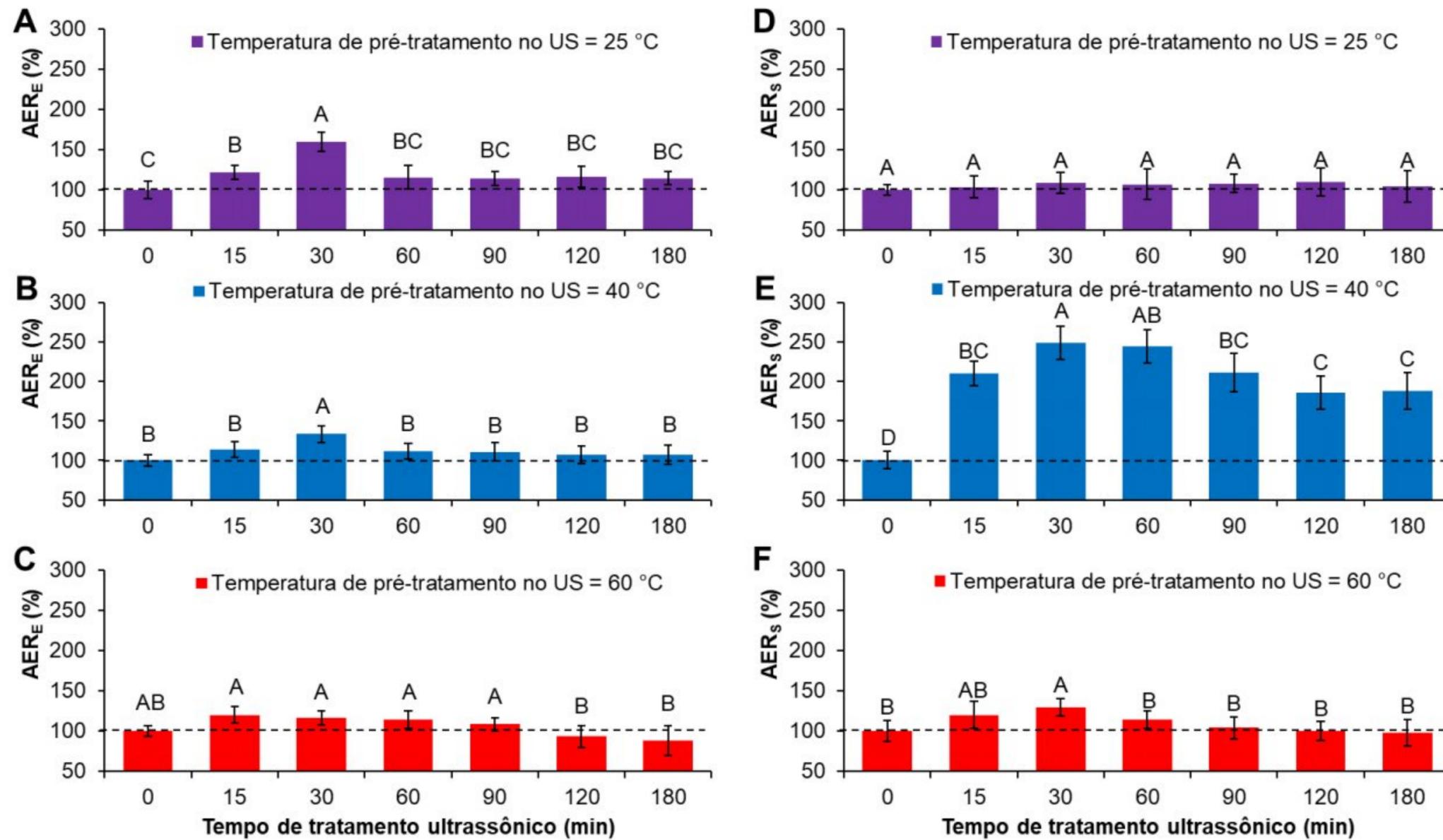


Figura 3. Atividade enzimática relativa medida a 60 °C/pH 7,50 em proteína de grilo preto (*Gryllus assimilis*) (PGP) usando Alcalase® (A, B e C = AERE, Eq. (2)) ou PGP (D, E e F = AERs, Eq. (2)) pré-tratados por ultrassom por até 180 min em diferentes temperaturas (25, 40 e 60 °C). Letras diferentes entre a amostra não processada (0 min) e as amostras processadas em tempos diferentes no mesmo pH e temperatura indicam diferenças significativas a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

3.3. Parâmetros cinéticos da hidrólise da proteína do grilo preto (*Gryllus assimilis*)

Para avaliação da cinética de hidrólise, o número de ligações peptídicas clivadas do substrato ao longo do processo foi quantificado pelo grau de hidrólise (GH). A Figura 4 mostra as curvas de hidrólise em diferentes temperaturas (25 °C, 40 °C e 60 °C), nas seguintes condições de tratamento: (i) hidrólise convencional com enzima e substrato em suas formas nativas (amostra controle), (ii) hidrólise convencional com Alcalase® pré-tratada por US (25 °C por 30 min), (iii) hidrólise convencional com PGP pré-tratada por US (40 °C por 30 min) e (iv) hidrólise assistida por US. A Tabela 1, por sua vez, apresenta os parâmetros cinéticos obtidos a partir destas curvas. Os resultados indicam que esses tratamentos podem aumentar ($p < 0,05$) os valores das taxas de hidrólises (até 227 %) e, concomitantemente, proporcionar um acréscimo nos valores de GH^∞ , $\text{GH}_{45 \text{ min}}$ e $\text{GH}_{180 \text{ min}}$, em relação ao controle (hidrólise convencional) (Tabela 1).

Como esperado, foi observado um maior GH^∞ na temperatura ótima da enzima (60°C) para todos os tratamentos avaliados ($p < 0,05$) (Tabela 1). Além disso, a hidrólise convencional apresentou menor GH^∞ quando comparada aos outros tratamentos ($p < 0,05$) independente da temperatura avaliada. O maior GH^∞ constatado foi para a PGP pré-processada por US (30'/40 °C) e hidrolisada a 60 °C ($\text{GH}^\infty = 16,6 \%$), demonstrando um aumento de 52,3 % no GH^∞ quando comparado a hidrólise convencional ($\text{GH}^\infty = 10,9 \%$).

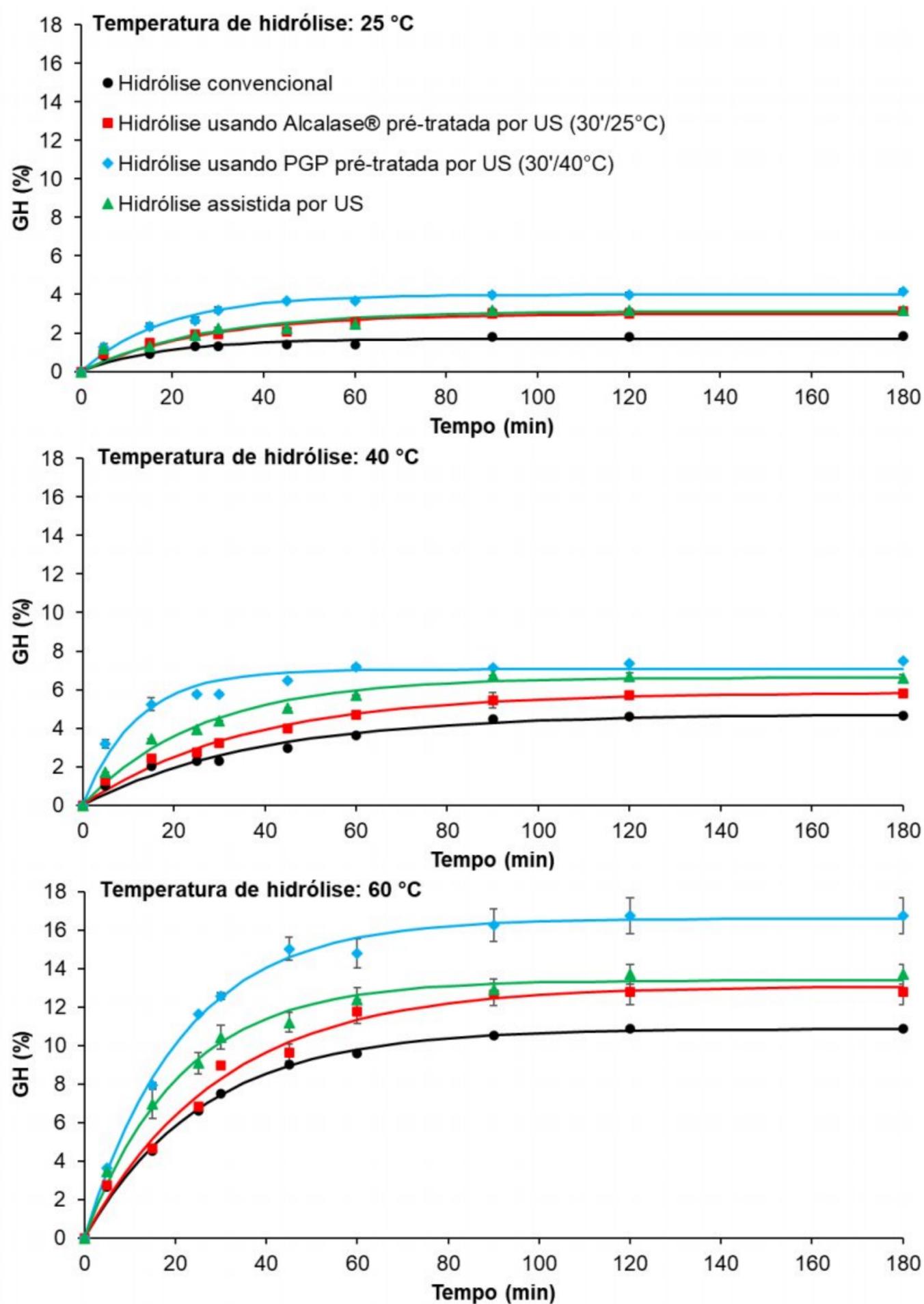


Figura 4. Hidrólise da proteína de grilo preto (PGP) por Alcalase® em diferentes temperaturas (25 °C, 40 °C, 60 °C) usando Alcalase® pré-tratada com US e PGP sob condições potencializadas ou assistidas por ultrassom. Os pontos são os valores experimentais, cada barra vertical representa o desvio padrão para cada condição e as curvas (linhas contínuas) representam os dados obtidos do modelo ajustado (Eq. (4)).

Tabela 1. Parâmetros da Eq. (4) ajustado para hidrólise de Alcalase® em proteína de grilo preto (PGP) em diferentes temperaturas de reação usando Alcalase® pré-tratada com ultrassom e PGP sob condições potencializadas ou assistidas por ultrassom.

| Hidrólise | T (°C) | Parâmetros da Eq. (4) | | | GH _{45 min} (%) | GH _{180 min} (%) |
|---|--------|-----------------------------|--------------------------|----------------|--------------------------|---------------------------|
| | | k (min ⁻¹) | GH _∞ (%) | R ² | | |
| Convencional | 25 °C | 0,053 ± 0,000 ^{Aa} | 1,7 ± 0,0 ^{Cc} | 0,943 | 1,4 ± 0,0 ^{Cc} | 1,9 ± 0,0 ^{Cc} |
| usando Alcalase® pré-tratada por US (30'/25 °C) | | 0,038 ± 0,000 ^{Ba} | 3,0 ± 0,0 ^{Bc} | 0,977 | 2,1 ± 0,0 ^{Bc} | 3,1 ± 0,0 ^{Bc} |
| usando PGP pré-tratada por US (30'/40 °C) | | 0,054 ± 0,006 ^{Ab} | 4,0 ± 0,1 ^{Ac} | 0,992 | 3,7 ± 0,1 ^{Ac} | 4,2 ± 0,0 ^{Ac} |
| Reação assistida por US | | 0,037 ± 0,000 ^{Bb} | 3,1 ± 0,1 ^{Bc} | 0,963 | 2,2 ± 0,1 ^{Bc} | 3,2 ± 0,0 ^{Bc} |
| Convencional | 40 °C | 0,026 ± 0,001 ^{Cc} | 4,7 ± 0,1 ^{Db} | 0,985 | 3,0 ± 0,0 ^{Db} | 4,7 ± 0,1 ^{Db} |
| usando Alcalase® pré-tratada por US (30'/25 °C) | | 0,028 ± 0,001 ^{Cb} | 5,8 ± 0,1 ^{Cb} | 0,991 | 4,0 ± 0,0 ^{Cb} | 5,8 ± 0,1 ^{Cb} |
| usando PGP pré-tratada por US (30'/40 °C) | | 0,085 ± 0,014 ^{Aa} | 7,0 ± 0,1 ^{Ab} | 0,981 | 6,4 ± 0,1 ^{Ab} | 7,5 ± 0,1 ^{Ab} |
| Reação assistida por US | | 0,039 ± 0,002 ^{Bb} | 6,6 ± 0,1 ^{Bb} | 0,988 | 5,0 ± 0,0 ^{Bb} | 6,6 ± 0,2 ^{Bb} |
| Convencional | 60 °C | 0,039 ± 0,001 ^{Bb} | 10,9 ± 0,1 ^{Ca} | 0,997 | 9,0 ± 0,1 ^{Ca} | 10,9 ± 0,1 ^{Ca} |
| usando Alcalase® pré-tratada por US (30'/25 °C) | | 0,033 ± 0,003 ^{Cb} | 13,1 ± 0,8 ^{Ba} | 0,994 | 9,6 ± 0,4 ^{Ca} | 12,8 ± 0,7 ^{Ba} |
| usando PGP pré-tratada por US (30'/40 °C) | | 0,047 ± 0,004 ^{Ab} | 16,6 ± 1,0 ^{Aa} | 0,998 | 15,0 ± 0,6 ^{Aa} | 16,7 ± 0,9 ^{Aa} |
| Reação assistida por US | | 0,048 ± 0,005 ^{Aa} | 13,4 ± 0,5 ^{Ba} | 0,996 | 11,2 ± 0,5 ^{Ba} | 13,7 ± 0,5 ^{Ba} |

* Média ± desvio padrão de nove replicatas (n = 9). Diferentes letras maiúsculas na coluna indicam diferença (p<0,05) entre os diferentes tratamentos na mesma temperatura e diferentes letras minúsculas na coluna indicam diferença (p<0,05) entre o mesmo tratamento em diferentes temperaturas. US: ultrassom. k = taxa de reação de hidrólise (min⁻¹) em determinada temperatura. GH_∞ = Grau final de hidrólise (%). GH_{45 min} e GH_{180 min} = grau de hidrólise aos 45 e 180 min de hidrólise, respectivamente (%).

3.4 Avaliação da solubilidade e atividade antioxidante *in vitro* de hidrolisados proteicos obtidos da hidrólise enzimática potencializada por US da proteína de grilo preto (*Gryllus assimilis*)

A Figura 5 apresenta a solubilidade em diferentes valores de pH (2, 4, 6, 8 e 10) do hidrolisado da PGP obtidos após 30, 60 e 180 min de hidrólise convencional, ou utilizando enzima ou substrato pré-processado por US ou produzidos durante hidrólise assistida por ultrassom. Os resultados mostram que a maior porcentagem de proteínas solúveis foi obtida em valores extremos de pH (93,8 % em pH 2,0 e 98,6 % em pH 10,0) após 180 min de hidrólise. Por outro lado, observa-se menor solubilidade em valores de pH 4 e 6, principalmente na proteína nativa (13,2 % em pH 4 e 22,6 % em pH 6).

Comparada à hidrólise convencional, a hidrólise usando substrato pré-processado por US aumentou a solubilidade na maioria das condições avaliadas, com um aumento de até 32 % (180 min de hidrólise em pH 10). Nos valores de pH de menor solubilidade (pH 4 e 6), que são os valores de pH de interesse industrial, a hidrólise usando substrato pré-processado e a reação assistida por US aumentaram a solubilidade dos hidrolisados (até 21,5 % em pH 4 e 23,7 % em pH 6) quando comparada a hidrólise convencional. Além disso, em todas as condições avaliadas, não foi observada menor solubilidade nas amostras tratadas por US em relação à hidrólise convencional.

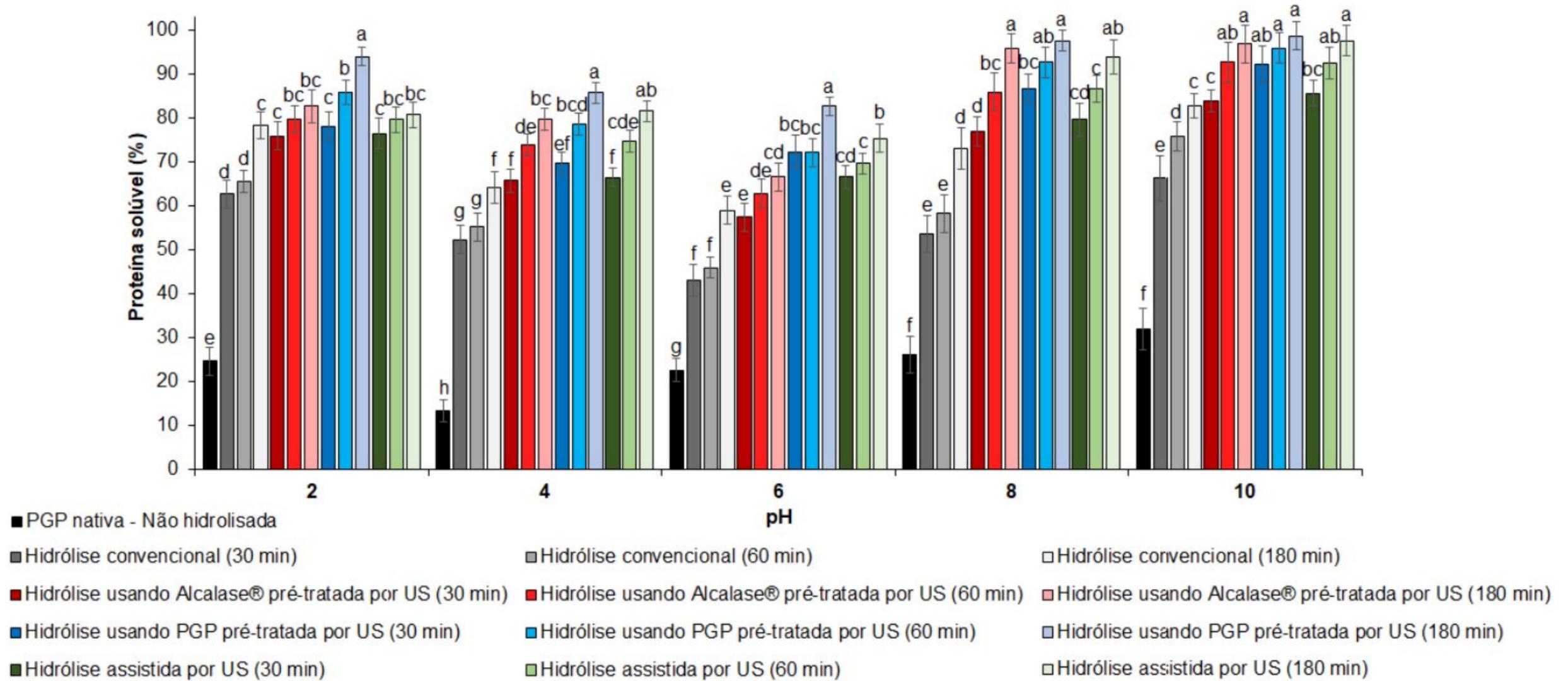


Figura 5. Solubilidade da proteína (%) de grilo preto (PGP) hidrolisada por 30, 60 e 180 min a 60 °C usando Alcalase® pré-tratada com US e PGP sob condições potencializadas ou assistida por ultrassom. *Letras diferentes em cada pH indicam diferenças significativas entre as amostras ($p < 0,05$).*

A avaliação da atividade antioxidante *in vitro* dos hidrolisados e da proteína não processada sobre os radicais ABTS e DPPH (Figura 6) mostrou que a hidrólise convencional aumentou a capacidade das amostras de eliminar os radicais DPPH e ABTS em até 2,3 vezes ($p < 0,05$) em comparação com a PGP não processada ($p < 0,05$). A comparação entre os diferentes tratamentos mostrou que os hidrolisados obtidos a partir do substrato pré-processado por US foram aqueles que apresentaram maior atividade antioxidante, indicando que o processo promoveu um aumento de até 3,3 vezes no ensaio DPPH e 10 vezes no de ABTS, em comparação com os valores obtidos para a PGP não processada ($p < 0,05$). Observa-se que após 30 min de hidrólise utilizando o substrato pré-tratado com US apresentou igual ou maior capacidade de eliminar os radicais DPPH e ABTS comparado com a hidrólise convencional após 180 min, respectivamente. Esse resultado é interessante e mostra uma aceleração de 6 vezes no tempo para geração dos compostos de interesse.

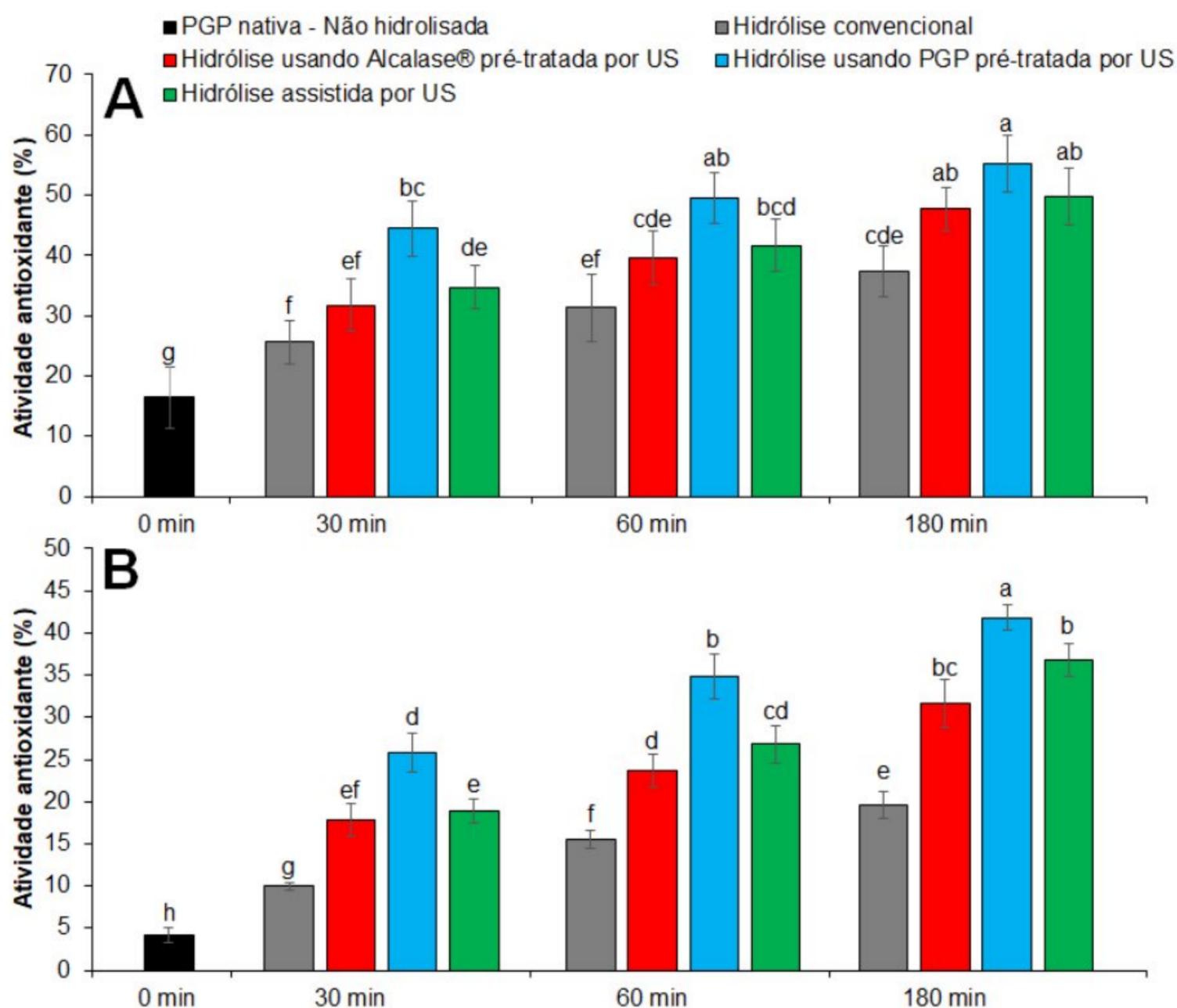


Figura 6. Atividade antioxidante *in vitro* dos ensaios (A) DPPH e (B) ABTS da PGP hidrolisada por até 180 min a 60 °C usando Alcalase® pré-tratada com US e PGP sob condições potencializadas ou assistida por ultrassom. Letras diferentes para cada ensaio indicam diferenças significativas entre as amostras ($p < 0,05$).

4. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, há um interesse crescente em usar produtos derivados de insetos como ingredientes alimentares para substituir produtos de origem animal tradicionais e reduzir efeitos ambientais negativos decorrentes da produção de carne. Além disso, novas tecnologias de processamento, como a tecnologia de ultrassom, estão sendo utilizadas com o intuito de melhorar o desempenho tecnológico das proteínas de forma eficiente e sustentável (Queiroz et al., 2022). Porém, vários parâmetros de processamento podem afetar a qualidade e o rendimento do produto. Quando se refere a insetos comestíveis,

especialmente grilo preto (*Gryllus assimilis*), há uma falta de conhecimento sobre como potencializar essas condições de processo para obter produtos com melhor rendimento e melhores propriedades biológicas e funcionais.

Neste estudo, foi analisado o impacto do ultrassom na atividade enzimática quando o US foi aplicado no pré-tratamento da enzima (Alcalase®), no substrato (PGP) e na reação assistida. A utilização dessa tecnologia emergente foi uma ferramenta importante para potencializar a reação e, quando empregada em condições de tempo e temperatura específicas, foi capaz de promover um aumento da atividade enzimática. No pré-processamento da Alcalase®, foi constatado que o melhor tempo e temperatura de processo foi a 25 °C durante 30 min, apresentando um aumento máximo na atividade enzimática relativa de 59,4 %. Em paralelo, a utilização do US durante 30 min a 40 °C no pré-tratamento do substrato, provocou um aumento máximo de 148,5 % da atividade enzimática.

O aumento da atividade enzimática causado pelo pré-processamento da enzima e do substrato pode ser explicado pelo fato do US ser capaz de provocar mudanças estruturais na PGP e na Alcalase®. A sonicação ocasiona o colapso das bolhas de cavitação, gerando grande quantidade de energia capaz de aumentar instantaneamente a temperatura e a pressão da região (Merouani et al., 2014; Soares et al., 2019). Essa energia pode ser suficiente para induzir alterações na estrutura terciária e secundária de proteínas, levando à ativação enzimática devido maior exposição de locais ativos (Hou et al., 2019; Mehrabani et al., 2022). Além disso, o US provoca uma diminuição no tamanho das partículas, aumentando a transferência de massa e a área superficial do substrato, acelerando a reação e ampliando a área de superfície acessível ao ataque enzimático (Nitayavardhana et al. 2008; Wang et al., 2018).

Outros estudos também comprovaram que o US é capaz de maximizar a atividade de outras enzimas. Soares et al. (2020) empregaram o ultrassom (25 kHz, 22 W/L) no pré-tratamento da lipase durante 45 min a 25 °C, e constataram um aumento de 12% na atividade enzimática. Yu et al. (2014) observaram mudanças na conformação da pepsina, atingindo um aumento de 14% na sua atividade, utilizando banho ultrassônico (300 W, 40 kHz, 0- 4°C) por 30 min.

Rivero-Pino et al. (2022) corroboraram efeitos positivos na aplicação do sonicador tipo sonda (500 W, 20 kHz) no pré-tratamento da farinha de larvas de

Tenebrio molitor usada como substrato na hidrólise enzimática para liberação de peptídeos inibidores de α -glicosidase. O pré-tratamento do substrato com US modificou a estrutura nativa da proteína e reduziu o tamanho da cadeia peptídica, favorecendo a liberação de peptídeos bioativos durante a hidrólise.

Os resultados da modelagem da cinética de hidrólise mostraram que o pré-processamento do substrato por US foi a estratégia que resultou em maior aumento da taxa de reação (entre 20,5 e 227 %), sugerindo que o dano estrutural prévio causado pelo US, com consequente redução do tamanho da partícula (Kim & Shin, 2022), foi o fator mais importante para aumentar a taxa da reação, enquanto as modificações estruturais da enzima não tiveram um efeito positivo nesta taxa. Por outro lado, a comparação dos valores dos GH experimentais (45 e 180 min) e GH^∞ (estabelecido pelo modelo) mostraram que os três tipos de intervenção por US estudados (pré-processamento da enzima e do substrato ou hidrólise assistida) resultaram em maior nível de hidrólise do que o processo convencional (entre 20 e 52,2 %). Porém, novamente, os melhores resultados foram obtidos para amostra contendo o substrato pré-processado por US, seguida pela hidrólise assistida. Esse resultado reforça a hipótese de que a alteração na conformação do substrato causada previamente ou concomitantemente com a hidrólise foi o efeito mais relevante para melhoria da cinética de hidrólise. Tal efeito pode ser explicado pelo desdobramento da proteína de grilo preto pelo processo de US, melhorando o acesso entre enzima e substrato (Wang et al., 2018), consequentemente proporcionando maior GH^∞ . Finalmente, a comparação dos valores de GH para um mesmo processo nas diferentes temperaturas mostraram que nenhum dos processos aplicados foi capaz de alterar a temperatura ótima da enzima visando a obtenção dos hidrolisados, ainda que o maior valor de k tenha sido observado quando o substrato foi pré-processado e a cinética realizada a 40 °C, mostrando que, apesar do aumento da taxa, a capacidade de hidrólise nesta condição permaneceu limitada. Vale ressaltar que, nesse estudo em específico, obter condições com maior GH é interessante, visto que mais ligações são clivadas, favorecendo a obtenção de peptídeos bioativos.

A solubilidade das proteínas é considerada um dos parâmetros técnico-funcionais mais críticos na ciência dos alimentos, pois essa propriedade influencia decisivamente em outras, como emulsificação, formação de espuma

e gelificação. Verificou-se que a solubilidade da PGP é dependente do pH, da hidrólise enzimática, do tempo de hidrólise e da utilização do US, apresentando maior solubilidade nos valores extremos de pH e tempo mais longo de hidrólise (180 min). A PGP apresentou menor solubilidade em pH 4, porém, nesse mesmo pH, o processo de hidrólise foi capaz de aumentar a solubilidade das proteínas, principalmente quando o substrato foi sonificado e hidrolisado por 180 min. Por outro lado, observou-se maior solubilidade em pH 10, para todos os tratamentos analisados.

Esses resultados eram esperados, porque assim como acontece com outras proteínas, a solubilidade das proteínas de insetos é tipicamente maior na faixa de pH alcalino. Além disso, a hidrólise enzimática diminui o peso molecular das proteínas, ocasionando um aumento de entropia e, conseqüentemente, uma maior solubilidade (Grossmann & McClements, 2022). Frequentemente, observa-se que um maior grau de hidrólise se correlaciona com um aumento na solubilidade, por exemplo, em leguminosas como o grão-de-bico, e também em proteínas de insetos, como *Alphitobius diaperinus* (Dent & Maleky, 2022; Leni et al., 2020).

Resultados semelhantes foram encontrados por Purschke et al. (2018), onde a solubilidade de hidrolisados da proteína de gafanhotos migratórios (*Locusta migratoria* L.) aumentou até 55 % em condições alcalinas em comparação com a proteína nativa (10-22 %). Hall et al. (2017) analisaram a solubilidade de hidrolisados proteicos de grilo tropical (*Gryllodes sigillatus*) em diferentes pH (3, 7, 8 e 10) e concluíram que os hidrolisados apresentaram maior solubilidade em pH alcalino (50-90 %).

De modo geral, as proteínas de insetos comestíveis apresentam menor solubilidade no seu ponto isoelétrico, como, na região de pH 4 para *Tenebrio molitor* e *Hermetia illucens* (Bußler et al., 2016). Porém, a solubilidade das proteínas é diferente entre as espécies e é amplamente afetada por diversos processamentos e sua intensidade (Mishyna et al., 2021). Nesse estudo, os resultados corroboram com essa afirmativa, visto que, a hidrólise enzimática e a utilização do US no substrato, na enzima e na reação assistida influenciaram significativamente na solubilidade ($p < 0.05$).

Nos últimos anos, estudos sobre peptídeos com atividade antioxidante tornaram-se um foco de pesquisa. Esses compostos podem ser obtidos de fontes

dietéticas naturais, sendo o seu consumo uma alternativa para a defesa contra o estresse oxidativo, permitindo a redução dos danos causados pelos radicais livres (Liang et al., 2019). Além dos benefícios à saúde, os peptídeos com capacidade antioxidante podem prevenir a oxidação lipídica em alimentos (Coelho et al., 2019), sendo uma alternativa às substâncias sintéticas comumente usadas, como butilhidroxianisol (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT) e a terc-butilhidroquinona (TBHQ) (Liu et al., 2012).

Os dados da atividade antioxidante *in vitro* dos ensaios DPPH e ABTS demonstraram que as amostras exibiram uma maior atividade de eliminação do radical DPPH e ABTS em 180 min de hidrólise, e o pré-tratamento da enzima, do substrato e reação assistida influenciaram positivamente na obtenção de melhores resultados. Nos dois ensaios, os hidrolisados obtidos a partir da PGP pré-processada por US apresentaram maior atividade sequestradora do radical DPPH e ABTS, reforçando a ideia de que o maior acesso ao ataque enzimático permitiu a formação de peptídeos de interesse.

Liu et al. (2017) avaliaram a capacidade antioxidante dos peptídeos obtidos pela hidrólise enzimática do bicho-da-seda (*Bombyx mori*), utilizando Alcalase® e uma protease alcalina (Danisco), e observaram que o hidrolisado apresentou boa capacidade de eliminar o radical DPPH (275 $\mu\text{mol/g}$). Zielińska et al. (2017) investigaram as atividades antioxidantes *in vitro* de peptídeos obtidos de barata dúbia (*Blaptica dubia*), barata de Madagascar (*Gromphadorhina portentosa*), gafanhoto-migratório (*Locusta migratoria*), tenébrio gigante (*Zophobas morio*) e grilo (*Amphiacusta annulipes*), fazendo uso de α -amilase, pepsina e pancreatina. Dentre os insetos estudados, o grilo apresentou maior capacidade de eliminar o radical DPPH (19,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

A avaliação geral dos resultados mostra que a hidrólise enzimática e o US são excelentes estratégias para melhorar a atividade antioxidante *in vitro* e a solubilidade da proteína de grilo preto. Na reação assistida, esperava-se obter peptídeos com maior capacidade antioxidante *in vitro* e melhor solubilidade em comparação com os outros tratamentos, visto que a reação poderia ser favorecida por alterações na enzima e substrato (Wang et al., 2018; Magalhães et al. 2022), além do ganho resultante do maior contato entre eles. Porém, os resultados gerais da atividade antioxidante dos ensaios DPPH e ABTS e solubilidade, sugerem que a PGP pré-processada por US (30'/40 °C) iguala ou

supera os ganhos obtidos pela hidrólise assistida por US. Diante disso, a indústria interessada em melhorar as propriedades dos hidrolisado pode optar pelo pré-tratamento do substrato com US (30'/40 °C) e posterior hidrólise a 60 °C durante 180 min ou pela reação assistida a 60 °C durante 180 min, baseando a decisão final no tamanho do equipamento, custo de energia e características dos hidrolisados obtidos.

5. CONCLUSÃO

Para todas as condições avaliadas, a hidrólise enzimática melhorou a solubilidade e potencializou a atividade antioxidante *in vitro* dos hidrolisados, quando comparado a proteína não processada. O efeito do ultrassom foi avaliado pela primeira vez em diferentes condições de processo para verificar seu efeito na Alcalase®, na PGP e na reação assistida. Nas condições de pré-tratamento avaliadas, constatou-se que o US foi mais favorável no pré-tratamento da enzima à 25 °C por 30 min (aumento de 59,4 % na atividade) e no substrato à 40 °C por 30 min (aumento de 148,5 % na atividade) ($p < 0,05$). A hidrólise da PGP sob condições potencializadas e assistidas por US proporcionou aumento de até 227 % na taxa de proteólise e até 52,2 % no grau de hidrólise final. Para a maioria das condições avaliadas, obteve-se melhores resultados de capacidade antioxidante e solubilidade utilizando PGP pré-processada por US (30'/40 °C). Por fim, os resultados confirmaram que o US pode ser uma excelente estratégia para potencializar a geração de hidrolisados a partir do grilo preto visando a produção de ingredientes com melhores propriedades biológicas e funcionais.

6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001; à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG, Brasil) pelo financiamento do projeto APQ-00388-21 e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo financiamento do projeto 429033/2018-4 e das bolsas de produtividade do B.R.C. Leite Júnior (306514/2020-6) e A.A.L. Tribst (305050/2020-6).

7. REFERÊNCIAS

- ADLER-NISSEN, Jens. **Enzymic hydrolysis of food proteins**. Elsevier applied science publishers, 1986.
- ARAÚJO, R. R. S.; dos SANTOS BENFICA, T. A. R.; FERRAZ, V. P.; SANTOS, E. M. Nutritional composition of insects *Gryllus assimilis* and *Zophobas morio*: Potential foods harvested in Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 76, p. 22-26, 2019.
- BUßLER, S.; RUMPOLD, B. A.; JANDER, E.; RAWEL, H. M.; SCHLÜTER, O. K. Recovery and techno-functionality of flours and proteins from two edible insect species: Meal worm (*Tenebrio molitor*) and black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. **Heliyon**, v. 2, n. 12, p. e00218, 2016.
- CHEMAT, F.; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 18, n. 4, p. 813-835, 2011.
- COELHO, M. S.; DE ARAUJO AQUINO, S.; LATORRES, J. M.; DE LAS MERCEDES SALAS-MELLADO, M. In vitro and in vivo antioxidant capacity of chia protein hydrolysates and peptides. **Food hydrocolloids**, v. 91, p. 19-25, 2019.
- DALAGNOL, L. M.; SILVEIRA, V. C.; DA SILVA, H. B.; MANFROI, V.; RODRIGUES, R. C. Improvement of pectinase, xylanase and cellulase activities by ultrasound: Effects on enzymes and substrates, kinetics and thermodynamic parameters. **Process Biochemistry**, v. 61, p. 80-87, 2017.
- DE MATOS, F. M.; DE LACERDA, J. T. J. G.; ZANETTI, G.; DE CASTRO, R. J. S. 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, p. 102276, 2022.
- DENT, T.; MALEKY, F. Pulse protein processing: The effect of processing choices and enzymatic hydrolysis on ingredient functionality. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1-12, 2022.
- DION-POULIN, A.; LAROCHE, M.; DOYEN, A.; TURGEON, S. L. Functionality of cricket and mealworm hydrolysates generated after pretreatment of meals with high hydrostatic pressures. **Molecules**, v. 25, n. 22, p. 5366, 2020.
- DWEVEDI, A. Basics of enzyme immobilization. **Enzyme immobilization: advances in industry, agriculture, medicine, and the environment**, p. 21-44, 2016.
- FAO. **A Situação Mundial da Pesca e Aquicultura 2020**. Sustentabilidade em ação. Roma. 2020.
- FAO. **Edible insects: Future prospects for food and feed security**. Rome. Food and Agriculture Organization of the United Nations-FAO. 2013.

GROSSMANN, L.; MCCLEMENTS, D. J. Current insights into protein solubility: A review of its importance for alternative proteins. **Food Hydrocolloids**, p. 108416, 2022.

HALL, F. G.; JONES, O. G.; O'HAIRE, M. E.; LICEAGA, A. M. Functional properties of tropical banded cricket (*Gryllobates sigillatus*) protein hydrolysates. **Food chemistry**, v. 224, p. 414-422, 2017.

HOU, F.; MA, X.; FAN, L.; WANG, D.; WANG, W.; DING, T.; LIU, D. Activation and conformational changes of chitinase induced by ultrasound. **Food chemistry**, v. 285, p. 355-362, 2019.

JÚNIOR, B. R. D. C. L.; TRIBST, A. A. L.; CRISTIANINI, M. Proteolytic and milk-clotting activities of calf rennet processed by high pressure homogenization and the influence on the rheological behavior of the milk coagulation process. **Innovative food science & emerging technologies**, v. 21, p. 44-49, 2014.

KIM, H. W.; SETYABRATA, D.; LEE, Y. J.; JONES, O. G.; KIM, Y. H. B. Pre-treated mealworm larvae and silkworm pupae as a novel protein ingredient in emulsion sausages. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 38, p. 116-123, 2016.

KIM, M. J.; SHIN, W. S. Structural and functional modification of proteins from black soybean Aquasoya via ultrasonication. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 91, p. 106220, 2022.

KUROZAWA, L. E.; PARK, K. J.; HUBINGER, M. D. Influence of process conditions on enzymatic hydrolysis kinetics of chicken meat. **Food Science and Technology**, v. 29, p. 557-566, 2009.

LANGE, K. W.; NAKAMURA, Y. Edible insects as future food: chances and challenges. **Journal of future foods**, v. 1, n. 1, p. 38-46, 2021.

LENI, G.; SOETEMANS, L.; CALIGIANI, A.; SFORZA, S.; BASTIAENS, L. Degree of hydrolysis affects the techno-functional properties of lesser mealworm protein hydrolysates. **Foods**, v. 9, n. 4, p. 381, 2020.

LIANG, R.; CHENG, S.; DONG, Y.; JU, H. Intracellular antioxidant activity and apoptosis inhibition capacity of PEF-treated KDHCH in HepG2 cells. **Food Research International**, v. 121, p. 336-347, 2019.

LICEAGA, A. (2022). Edible insects, a valuable protein source from ancient to modern times. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 101, p. 129, 2022.

LIU, S.; SUN, J.; YU, L.; ZHANG, C.; BI, J.; ZHU, F.; YANG, Q. Antioxidant activity and phenolic compounds of *Holotrichia parallela* Motschulsky extracts. **Food chemistry**, v. 134, n. 4, p. 1885-1891, 2012.

LIU, Y.; WAN, S.; LIU, J. U. N.; ZOU, Y.; LIAO, S. Antioxidant activity and stability study of peptides from enzymatically hydrolyzed male silkworm. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, n. 1, p. e13081, 2017.

MACHADO, C. R.; THYS, R. C. S. Cricket powder (*Gryllus assimilis*) as a new alternative protein source for gluten-free breads. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 56, p. 102180, 2019.

MAGALHÃES, I. S.; GUIMARÃES, A. D. B.; TRIBST, A. A. L.; de OLIVEIRA, E. B.; JÚNIOR, B. R. D. C. L. Ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis of goat milk casein: Effects on hydrolysis kinetics and on the solubility and antioxidant activity of hydrolysates. **Food Research International**, v. 157, p. 111310, 2022.

MEROUANI, S.; HAMDAROU, O.; REZGUI, Y.; GUEMINI, M. Theoretical estimation of the temperature and pressure within collapsing acoustical bubbles. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 21, n. 1, p. 53-59, 2014.

MINTAH, B. K.; HE, R.; DABBOUR, M.; XIANG, J.; AGYEKUM, A. A.; MA, H. Techno-functional attribute and antioxidative capacity of edible insect protein preparations and hydrolysates thereof: Effect of multiple mode sonochemical action. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 58, p. 104676, 2019.

MINTAH, B. K.; HE, R.; DABBOUR, M.; XIANG, J.; JIANG, H.; AGYEKUM, A. A.; MA, H. Characterization of edible soldier fly protein and hydrolysate altered by multiple-frequency ultrasound: Structural, physical, and functional attributes. **Process Biochemistry**, v. 95, p. 157-165, 2020.

MISHYNA, M.; KEPPLER, J. K.; CHEN, J. Techno-functional properties of edible insect proteins and effects of processing. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 56, p. 101508, 2021.

MONTIEL-AGUILAR, L. J.; TORRES-CASTILLO, J. A.; RODRÍGUEZ-SERVIN, R.; LÓPEZ-FLORES, A. B.; AGUIRRE-ARZOLA, V. E.; MÉNDEZ-ZAMORA, G.; SINAGAWA-GARCÍA, S. R. Nutraceutical effects of bioactive peptides obtained from *Pterophylla beltrani* (Bolivar & Bolivar) protein isolates. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 23, n. 3, p. 756-761, 2020.

NITAYAVARDHANA, S.; RAKSHIT, S. K.; GREWELL, D.; VAN LEEUWEN, J.; KHANAL, S. K. Ultrasound pretreatment of cassava chip slurry to enhance sugar release for subsequent ethanol production. **Biotechnology and bioengineering**, v. 101, n. 3, p. 487-496, 2008.

NONGONIERMA, A. B.; FITZGERALD, R. J. Unlocking the biological potential of proteins from edible insects through enzymatic hydrolysis: A review. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 43, p. 239-252, 2017.

O'DONNELL, C. P.; TIWARI, B. K.; BOURKE, P.; CULLEN, P. J. Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance. **Trends in food science & technology**, v. 21, n. 7, p. 358-367, 2010.

PURSCHE, B.; MEINLSCHMIDT, P.; HORN, C.; RIEDER, O.; JÄGER, H. Improvement of techno-functional properties of edible insect protein from migratory locust by enzymatic hydrolysis. **European Food Research and Technology**, v. 244, p. 999-1013, 2018.

QUEIROZ, L. S.; SILVA, N. F. N.; FERNANDES DE CARVALHO, A.; CASANOVA, F. (2022). Impact of emerging technologies on colloidal properties of insect proteins. **Current Opinion in Food Science**, p. 100958, 2022.

RIVERO-PINO, F.; ESPEJO-CARPIO, F. J.; PÉREZ-GÁLVEZ, R.; GUADIX, A.; GUADIX, E. M. Effect of ultrasound pretreatment and sequential hydrolysis on the production of *Tenebrio molitor* antidiabetic peptides. **Food and Bioprocess Processing**, v. 123, p. 217-224, 2020.

ROJAS, M. L.; TREVILIN, J. H.; dos SANTOS FUNCIA, E.; GUT, J. A. W.; AUGUSTO, P. E. D. Using ultrasound technology for the inactivation and thermal sensitization of peroxidase in green coconut water. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 36, p. 173-181, 2017.

RONCOLINI, A.; MILANOVIĆ, V.; AQUILANTI, L.; CARDINALI, F.; GAROFALO, C.; SABBATINI, R.; OSIMANI, A. Lesser mealworm (*Alphitobius diaperinus*) powder as a novel baking ingredient for manufacturing high-protein, mineral-dense snacks. **Food Research International**, v. 131, p. 109031, 2020.

SOARES, A. D. S.; LEITE JÚNIOR, B. R. D. C.; TRIBST, A. A. L.; AUGUSTO, P. E. D.; RAMOS, A. M. Effect of ultrasound on goat cream hydrolysis by lipase: Evaluation on enzyme, substrate and assisted reaction. **LWT**, v. 130, p. 109636, 2020.

SOARES, A. D. S.; AUGUSTO, P. E. D.; LEITE JÚNIOR, B. R. D. C.; NOGUEIRA, C. A.; VIEIRA, É. N. R.; de BARROS, F. A. R.; RAMOS, A. M. Ultrasound assisted enzymatic hydrolysis of sucrose catalyzed by invertase: Investigation on substrate, enzyme and kinetics parameters. **LWT**, v. 107, p. 164-170, 2019.

TACIAS-PASCACIO, V. G.; MORELLON-STERLING, R.; SIAR, E. H.; TAVANO, O.; BERENQUER-MURCIA, A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Use of Alcalase in the production of bioactive peptides: A review. **International journal of biological macromolecules**, v. 165, p. 2143-2196, 2020.

ULUG, S. K.; JAHANDIDEH, F.; WU, J. Novel technologies for the production of bioactive peptides. **Trends in Food Science & Technology**, v. 108, p. 27-39, 2021.

WANG, D.; YAN, L.; MA, X.; WANG, W.; ZOU, M.; ZHONG, J.; LIU, D. Ultrasound promotes enzymatic reactions by acting on different targets: Enzymes, substrates and enzymatic reaction systems. **International journal of biological macromolecules**, v. 119, p. 453-461, 2018.

WANG, Y. Y.; WANG, C. Y.; WANG, S. T.; LI, Y. Q.; MO, H. Z.; HE, J. X. Physicochemical properties and antioxidant activities of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) seed protein hydrolysates obtained with different proteases. **Food Chemistry**, v. 345, p. 128765, 2021.

YU, Z. L.; ZENG, W. C.; ZHANG, W. H.; LIAO, X. P.; SHI, B. Effect of ultrasound on the activity and conformation of α -amylase, papain and pepsin. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, n. 3, p. 930-936, 2014.

ZIELIŃSKA, E.; KARAŚ, M.; JAKUBCZYK, A. Antioxidant activity of predigested protein obtained from a range of farmed edible insects. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 52, n. 2, p. 306-312, 2017.

CONCLUSÃO GERAL

A proteína de grilo preto é um alimento que possui grande potencial na produção de peptídeos bioativos e técnico-funcionais, devido ao teor de proteínas com alto valor biológico e menor impacto ambiental quando comparado ao consumo de proteínas animais de fontes tradicionais. Apesar da hidrólise enzimática ser o principal método na obtenção de peptídeos, apresentam algumas desvantagens, como longo tempo de processo e baixo rendimento. Diante disso, suas limitações impulsionam o uso de tecnologias, como o ultrassom, visando fornecer melhor rendimento em menor tempo.

Neste estudo, verificou-se que o US aumentou a taxa de proteólise (até 227%) e o grau de hidrólise (até 52,2%), e esses resultados podem estar relacionados à aceleração da transferência de massa durante a reação assistida ou tratamento do substrato por US, além de possíveis alterações físico-químicas e estruturais na PGP, resultando no desdobramento da estrutura complexa da proteína em uma matriz mais simples. Além disso, o US influenciou positivamente no perfil dos hidrolisados, sendo possível a obtenção de hidrolisados com melhor capacidade antioxidante (até 47,8% para DPPH e 113,6% para ABTS) e solubilidade (9,7%), em relação a hidrólise convencional (sem US). Diante disso, a hidrólise assistida por US ou o pré-tratamento da PGP pode ser uma estratégia para potencializar o processo de hidrólise, obtendo peptídeos bioativos e técnico-funcionais.

No entanto, mais estudos precisam ser desenvolvidos para elucidar a associação dessa tecnologia como pré-tratamento da enzima, substrato e reação assistida. Além disso, é necessário a purificação dos hidrolisados com melhor atividade antioxidante e maior solubilidade (PGP pré-processada por US (30'/40 °C) e hidrolisado a 60 °C, bem como a reação assistida por 180 min a 60 °C) e investigar possíveis alergenicidade dos peptídeos produzidos e digestão gastrointestinal simulada.