

Efeitos das diferentes condições de processo na avaliação da hidrólise enzimática de barata cinérea (*Nauphoeta cinerea*)**Effects of the different process conditions in the evaluation of enzymatic hydrolysis in cinera cheap (*Nauphoeta cinerea*)**

DOI:10.34117/bjdv6n7-510

Recebimento dos originais: 03/06/2020

Aceitação para publicação: 21/07/2020

Andressa Jantzen da Silva Lucas

Doutoranda em Engenharia e Ciências de Alimentos pela Universidade Federal do Rio Grande

Instituição: Universidade Federal do Rio Grande

Endereço: Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Campus Carreiros, Avenida Itália Km 8, Rio Grande RS, Brasil

E-mail: andressalucas@furg.br

Meritaine da Rocha

Doutora em Engenharia e Ciências de Alimentos pela Universidade Federal do Rio Grande

Instituição: Universidade Federal do Rio Grande

Endereço: Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Campus Cidade Alta, Rua Barão do Cahy, 125, Santo Antônio da Patrulha RS, Brasil

E-mail: meritaine@gmail.com

Carolina Dias Medeiros Saad

Graduanda do curso de Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal do Rio Grande

Instituição: Universidade Federal do Rio Grande

Endereço: Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Campus Carreiros, Avenida Itália Km 8, Rio Grande RS, Brasil

E-mail: csaad97@gmail.com

Carlos Prentice

Doutor Engenharia de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas

Instituição: Universidade Federal do Rio Grande

Endereço: Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Campus Carreiros, Avenida Itália Km 8, Rio Grande RS, Brasil

E-mail: dqmprent@furg.br

RESUMO

Hidrolisados e peptídeos bioativos derivados de proteínas de diversas fontes de alimentos tem despertado o interesse para a produção de compostos nutracêuticos e funcionais. Insetos comestíveis, como a barata cinérea (*Nauphoeta cinerea*) são fontes viáveis de peptídeos bioativos, devido ao seu alto teor de proteínas e produção sustentável. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi a elaboração de hidrolisados proteicos provenientes da barata cinérea em duas condições, desidratada e congelada, utilizando duas enzimas proteolíticas, Alcalase e Protamex, a fim de avaliar o efeito destas na obtenção de hidrolisados proteicos. Para tanto, primeiramente os dois tipos de barata cinérea, seja desidratada ou congelada, foram caracterizados quanto a sua composição proximal em triplicata. Após, a barata cinérea desidratada ou congelada, foi hidrolisada (10% de proteína; m/v; proteína/água) utilizando como enzimas a Alcalase ou Protamex (3%; m/m; enzima/substrato) em pH 8,0 e a 50 °C

pelo método de *pH-Stat*, até grau de hidrólise (GH) constante. Estas foram caracterizadas quanto ao GH e composição proximal (proteína e umidade), respectivamente. Como resultados, se observou que houve diferença significativa ($p > 0,05$) somente em relação ao teor de lipídios e proteínas entre as amostras de barata cinérea desidratada e congelada, sendo maiores o teor de proteína no inseto desidratado, e de lipídios no inseto congelado. Em relação ao GH, verificou-se que o hidrolisado proteico de barata desidratada obtido em 260 min de hidrólise, tratado com a enzima Alcalase – SA apresentou o maior grau de hidrólise (GH) de 17,01%, em relação ao de barata congelada hidrolisada com Alcalase – CA (11,34%), barata congelada hidrolisada com Protamex – CP (6,54%), e barata desidratada hidrolisada com Protamex – SP (7,85%). Além disso, os hidrolisados proteicos de barata congelada e desidratada obtidos com Protamex mostraram conteúdo significativamente superior ($p < 0,05$) de proteínas com 74,6% e 73,2%, respectivamente, em relação aos hidrolisados elaborados com Alcalase. Este estudo sugere que é possível se obter hidrolisados proteicos com a enzima Protamex a partir de barata cinérea e que estes insetos podem ser utilizados como uma fonte de proteína alternativa às já existentes.

Palavras-chave: Insetos comestíveis, Enzimas, Secagem, Congelamento, Proteína.

ABSTRACT

Hydrolysates and bioactive peptides derived from proteins from different food sources have aroused interest in the production of nutraceutical and functional compounds. Edible insects, such as the cinereous cockroach (*Nauphoeta cinerea*) are viable sources of bioactive peptides, due to their high protein content and sustainable production. In this context, the objective of the present study was to prepare protein hydrolysates from the cinnamon cockroach in two conditions, dehydrated and frozen, using two proteolytic enzymes, Alcalase and Protamex, in order to evaluate the effect of these in obtaining protein hydrolysates. Therefore, firstly, the two types of cinnamon cockroach, whether dehydrated or frozen, were characterized as to their proximal composition in triplicate. Afterwards, the dried or frozen cinnamon cockroach was hydrolyzed (10% protein; m / v; protein / water) using Alcalase or Protamex (3%; m / m; enzyme / substrate) as enzymes at pH 8.0 and at 50 ° C by the pH-Stat method, until constant hydrolysis (GH) degree. These were characterized in terms of GH and proximal composition (protein and moisture), respectively. As a result, it was observed that there was a significant difference ($p > 0.05$) only in relation to the content of lipids and proteins between the samples of dried and frozen cinnamon cockroaches, with higher levels of protein in the dehydrated insect and lipids in the insect. frozen. In relation to GH, it was found that the protein hydrolyzate of dehydrated cockroach obtained in 260 min of hydrolysis, treated with the enzyme Alcalase - SA presented the highest degree of hydrolysis (GH) of 17.01%, in relation to that of frozen cockroach hydrolyzed with Alcalase - CA (11.34%), frozen cockroach hydrolyzed with Protamex - CP (6.54%), and dehydrated cockroach hydrolyzed with Protamex - SP (7.85%). In addition, the frozen and dehydrated cockroach protein hydrolysates obtained with Protamex showed significantly higher protein content ($p < 0.05$) with 74.6% and 73.2%, respectively, compared to the hydrolysates made with Alcalase. This study suggests that it is possible to obtain protein hydrolysates with the enzyme Protamex from cinnamon cockroaches and that these insects can be used as an alternative protein source to those that already exist.

Keywords: Edible insects, Enzymes, Drying, Freezing, Protein.

1 INTRODUÇÃO

As novas fontes sustentáveis de proteína para alimentação humana estão sendo exploradas na tentativa de resolver os problemas da insegurança alimentar, devido ao aumento da população mundial (VAN HUIS et al., 2013). Os métodos disponíveis para processar insetos, a fim de se produzir alimentos para animais e humanos, precisam ser avaliados quanto à sua capacidade de garantir os mais altos padrões nutricionais e de qualidade nos produtos finais. Estes devem remover os componentes e contaminantes indesejados específicos de insetos (toxinas e antinutrientes), uma vez que os diferentes métodos de processamento tecnológico afetam as propriedades nutricionais e funcionais da matéria-prima, bem como do produto final (PAYNE et al., 2015).

Em geral, os insetos comestíveis são considerados boa fonte de proteínas, gorduras, fibras, vitaminas e minerais (LUCAS et al., 2020). O conteúdo de proteínas de insetos comestíveis pode variar de 50 a 70% em base seca (SOSA; FOGLIANO, 2017) e apresentam um excelente perfil de aminoácidos (OLIVEIRA et al., 2017). A barata cinérea pode estar entre as diversas espécies de baratas existentes. Ela também é popularmente conhecida como barata salpicada ou barata lagosta (Ordem: Blattodea, Família: Blaberidae), sendo originária da África apresentando ampla distribuição geográfica devido a sua fácil associação com seres humanos (SANTOS et al., 2016). A composição química deste inseto varia de acordo com seu estágio de crescimento, apresentando aproximadamente 68,5% de proteína e 22,5% de lipídios em sua fase adulta (LUCAS; OLIVEIRA; PRENTICE, 2019). A barata cinérea possui todos os nove aminoácidos essenciais em sua composição, bem como ácidos graxos insaturados dos tipos ômega 6 e ômega 9 (OLIVEIRA et al., 2017).

O fato de a concentração de proteína contida na barata cinérea ser elevada faz com que a extração e o fracionamento proteico, que são etapas necessárias para produzir ingredientes oriundos de proteínas de insetos, sejam facilitados. Atualmente, um dos melhores meios de se obter os benefícios do consumo de insetos é utilizar seus componentes em forma de isolados, como por exemplo, em isolados proteicos. Além disto, a modificação enzimática de proteínas (hidrólise enzimática) é um mecanismo útil que pode ser utilizado para aumentar a funcionalidade e a disponibilidade de compostos bioativos das proteínas, quando comparadas com as proteínas não nativas (HALL et al., 2017; LUCAS et al., 2020). A hidrólise enzimática de insetos geralmente é realizada com insetos homogeneizados ou a partir de isolados de proteínas de insetos (CASTRO et al., 2018; NONGONIERMA; FITZGERALD, 2017), sendo que o isolado pode ser realizado seguindo algumas etapas: homogeneização, desengorduramento, solubilização de proteínas, precipitação isoelétrica de proteínas, ressolubilização de proteínas seguidas por uma etapa de desidratação (NONGONIERMA; FITZGERALD, 2017).

Mediante o exposto, o objetivo desta pesquisa foi o desenvolvimento de hidrolisados proteicos a partir da barata cinérea (*Nauphoeta cinerea*), tanto desidratada como congelada, utilizando duas enzimas (Alcalase e Protamex), a fim de avaliar o efeito destas condições de trabalho nos hidrolisados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS

A barata cinérea desidratada foi fornecida pela empresa Insetos Kaissara (Além Paraíba, Minas Gerais, Brasil). Este criadouro é certificado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil. As enzimas utilizadas para hidrólise das amostras foram Alcalase (3.4.21.62), endopeptidase bacteriana produzida a partir da fermentação submersa de *Bacillus licheniformis*, doada pela Novozymes Latin America (Araucária - Brasil), e Protamex (EC 3.4.21.62; EC 3.4.24.28), mistura de exo- e endopeptidases bacterianas, produzida a partir do *Bacillus* sp. adquirida da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, Estados Unidos). Os demais reagentes utilizados no presente estudo foram de grau analítico (P.A.).

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Pré-tratamento

O primeiro grupo, insetos desidratados, foi triturado em moinho de facas (Marconi, Wiley Mill Standard nº 03, Estados Unidos) e peneirados em peneira de 42 mesh (Bertel, Caieiras, Brasil) para a padronização do tamanho da partícula conforme o método descrito por Oliveira (2017). A amostra foi embalada em recipientes de polietileno e armazenada em temperatura de refrigeração até hidrólise.

Já os insetos vivos foram obtidos de uma cultura de laboratório mantida no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA), da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) para fins exclusivos de pesquisa. Esses foram abatidos vivos, por congelamento em ultrafreezer (Indrel, IULT 90-D, Brasil) mantidos à temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento do uso. Antes de realizar as análises, os insetos foram descongelados sob refrigeração ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) *overnight* (HALL et al., 2017). Logo, foi elaborada uma pasta utilizando moinho de facas (Wiley Moinho Padrão nº. 03, Estados Unidos) e esta foi destinada ao ensaio de hidrólise enzimática.

2.2.2 Caracterização da matéria-prima

Os teores de umidade (método nº 935.29), cinza (método nº 932.03), proteína (método micro-Kjedahl, nº 920.87) e lipídios (método Soxhlet, nº 925,30) dos diferentes tratamentos da barata cinérea foram determinados de acordo com o método descrito pela AOAC (2000). O fator de conversão N utilizado para a proteína foi de 5,6 de acordo com o método descrito por Janssen et al.

(2017). Já os carboidratos foram obtidos por diferença. A caracterização da matéria-prima foi realizada na barata cinérea desidratada, congelada e nos hidrolisados proteicos liofilizados.

2.2.3 Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática foi realizada de acordo com o método descrito por Hall et al. (2017) com modificações e acompanhada pelo método de pH-stat, a partir das diferentes amostras de barata cinérea. As diferentes amostras, insetos desidratados (em forma de farinha) ou congelados (em forma de pasta), foram homogeneizadas em água destilada na proporção de 10% (m/v; proteína/água;) em reator de vidro encamisado acoplado de banho ultratermostático (Quimis, Q212S, Brasil), sob agitação constante (Fisatom, Brasil) a 500 rpm. As condições das dispersões proteicas, foram ajustadas em pH: 8 à temperatura de 50 °C para Alcalase e Protamex, durante 10 min com hidróxido de sódio 1 M.. A hidrólise enzimática iniciou-se adicionando a enzima na proporção de 3% (m/m; enzima/substrato). O grau de hidrólise (GH) foi monitorado a cada 10 min até se tornar constante. Ao final da reação, as enzimas foram inativadas em banho-maria a 90 °C por 15 min. As diferentes dispersões foram centrifugadas a $9000 \times g$ por 20 min a 4 °C (Hanil Supra 22K, Coréia do Sul), para separar as frações solúvel (hidrolisado proteico) e insolúvel (quitina e minerais). A fração solúvel foi desidratada em liofilizador (Liotop, L108, São Carlos, Brasil) a - 55 °C e 50 μ Hg durante 48 h e após acondicionada em recipientes de polietileno e armazenada em temperatura de refrigeração até o uso. O grau de hidrólise (GH) foi monitorado de acordo com Adler-Nissen (1986). Destes foram realizados quatro tratamentos distintos: inseto congelado hidrolisado com Alcalase (CA), inseto congelado hidrolisado com Protamex (CP), inseto desidratado hidrolisado com Alcalase (SA), e inseto desidratado hidrolisado com Protamex (SP).

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos realizados foram realizados em triplicata. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas, seja pelo teste de Tukey ou teste de *t-Student*, no nível de 5% de significância, utilizando o software Statistica (versão 5.0; StatSoft, Inc., Tulsa, EUA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

Devido à facilidade de manejo dos insetos, a caracterização da matéria-prima foi realizada utilizando barata cinérea em ambas as fases de seu desenvolvimento (ninfá e adulto). Os conteúdos

de proteínas, lipídios, cinzas, umidade e carboidratos para barata cinérea (*Nauphoeta cinerea*) seca e congelada estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição proximal de barata cinérea (*Nauphoeta cinerea*) desidratada e congelada (em base seca)

Componentes	Barata cinérea desidratada	Barata cinérea congelada
Cinzas (%)	4,0 ± 0,2 ^a	3,8 ± 0,1 ^a
Lipídios (%)	17,9 ± 0,1 ^b	25,6 ± 0,1 ^a
Proteína (%)	59,1 ± 0,5 ^a	56,2 ± 0,6 ^b
Carboidratos (%)*	19,0*	14,4*

*Valores estimados por diferença. Média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam que há diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste *t-Student*.

Ao observar os resultados obtidos, pode-se perceber que houve diferença significativa ($p > 0,05$) em relação ao teor de lipídios e proteínas entre as amostras de barata cinérea desidratada e congelada. Isto pode ter ocorrido, devido à diferença das dietas dos insetos obtidos, pois esses foram obtidos de diferentes criadouros. Segundo Van Huis et al. (2013) as características composicionais das dietas dos insetos podem afetar diretamente a matriz influenciado em seu conteúdo de lipídios, proteínas entre outros. Além disto, como os insetos foram capturados em diferentes estágios de desenvolvimento, este fator também pode ter influenciado no conteúdo de proteína e lipídios obtidos, pois segundo Lucas et al. (2019) o estado reprodutivo dos insetos influencia em sua composição química

Estudo utilizando a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), mostraram, que diferentes tratamentos podem ter diferentes efeitos na composição proximal, o que foi atribuído às mudanças químicas e físicas causadas pela exposição ao aquecimento ou ao congelamento (CHUKWU, 2009). Sabe-se, por exemplo, que a gordura exsuda com a evaporação, durante o processo de secagem aumenta o efeito das perdas lipídicas e dos ácidos graxos. Este fenômeno foi observado em pescado em comparação com diferentes métodos de preservação, conforme descrito por Chukwu (2009) e também pode ter ocorrido durante este estudo, uma vez o conteúdo lipídico obtido para barata seca (17,9%) foi significativamente inferior ($p < 0,05$) quando comparado ao conteúdo lipídico contido na barata congelada (25,6%).

O conteúdo de cinzas não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$), onde a barata seca apresentou 4% e a barata congelada cerca de 3,8%, o que sugere a presença de outros componentes, principalmente a quitina. A qualidade da proteína e o conteúdo em insetos são diretamente influenciados pela etapa de processamento. O teor de proteína da barata cinérea seca (59,1%) foi significativamente superior ($p < 0,05$) ao da barata congelada (56,2%). De fato, durante o congelamento, a estrutura celular é danificada por diversos fatores, tais como aumento do volume

celular, crescimento de cristais de gelo em forma de agulha e consequente ruptura das membranas celulares, causando alterações de alguns metabólitos sensíveis (MAZUR, 1984), e como consequência, em alguns casos, a diminuição de teor de proteínas na amostra.

Quando comparados os resultados obtidos para as diferentes amostras de cinzas, proteínas e carboidratos (Tabela 1), as diferenças entre os tratamentos aplicados não parece ter apresentado grande interferência na matriz. Porém, do ponto de vista molecular, podem ter ocorridas mudanças.

Melis et al. (2018) compararam os efeitos da secagem e do congelamento em tenébrio comum (*Tenebrio molitor*), onde verificaram que os rearranjos moleculares durante a secagem envolvem alterações ao nível de compostos lipídicos e metabólitos aquosos de baixa massa molecular. A sua concentração na matriz resulta em uma combinação complexa de hidrólise, proteólise, fenômenos oxidativos, atividade enzimática e geração de agregados de diferentes compostos. Quando secos os cupins comestíveis e o gafanhoto (*Ruspolia differens*), apresentam redução na digestibilidade proteica

em 7%. Além disso, quando esses insetos foram expostos à secagem solar, observou-se uma diminuição geral em todo o seu conteúdo vitamínico, e este tratamento levou a uma perda maior (64%) do conteúdo de riboflavina quando comparado com amostras frescas (KINYURU et al., 2010).

O congelamento tem desvantagens relacionadas à perda do paladar, a degradação pode ser favorecida devido à ruptura da membrana celular, causando alterações em alguns metabólitos sensíveis. Em particular, ao que se refere aos lipídios, os autores observaram que os constituintes mais afetados podem ser os dos fosfolipídios. Entre os metabólitos aquosos, alguns compostos que contêm nitrogênio, como colina e orto-fosfocolina, aumentam significativamente durante o processo de congelamento (MELIS et al., 2018).

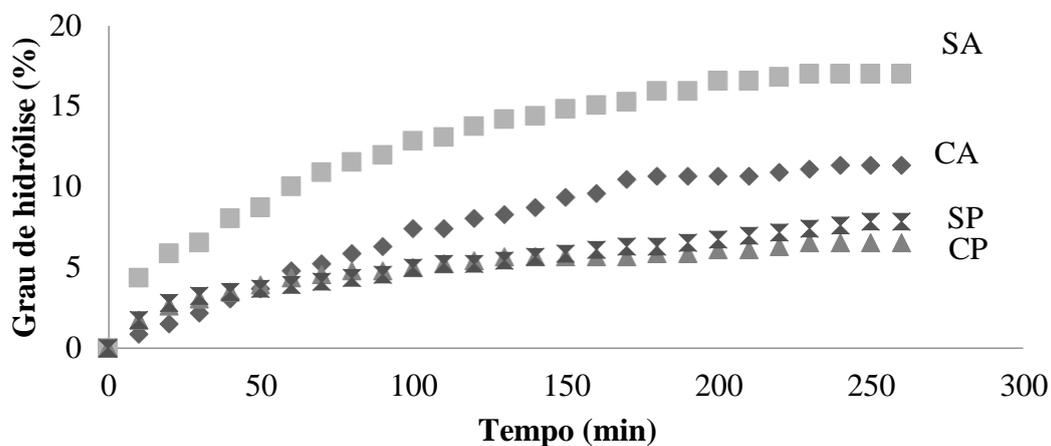
3.2 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Atualmente, há um crescente interesse nas aplicações de proteínas e peptídeos oriundos de diversas matrizes proteicas em alimentos funcionais ou nutracêuticos como alternativa aos tratamentos convencionais (HALL et al., 2017). Os peptídeos bioativos liberados por hidrólise enzimática das proteínas da dieta apresentam bioatividade, tais como antimicrobiana e antioxidante, entre outras (LUCAS et al., 2020; NONGONIERMA; FITZGERALD, 2017; ZIELIŃSKA et al., 2017; ZAMORA-SILLERO et al., 2018). Estes peptídeos bioativos estão inativos dentro das sequências das proteínas, mas podem ser liberados por diferentes processos e em seguida eles exercem várias funções fisiológicas (LUCAS et al., 2020). Dentre os diferentes métodos de obtenção dos peptídeos bioativos, a hidrólise enzimática é largamente utilizada nas indústrias de alimentos e farmacêuticas. Os processos enzimáticos apresentam muitas vantagens, quando comparado aos

tratamentos químicos, tais como altas taxas de reação em condições amenas e com grande especificidade (BRYSKA; YADA, 2015; NAJAFIAN; BABJI, 2012).

A Figura 1 apresenta a hidrólise proteica das diferentes amostras de barata cinérea utilizando a Alcalase e Protamex como enzimas. Observou-se, nos primeiros 20-50 min, altas velocidades de reação seguida de velocidades menores. Segundo Adler-Nissen (1986) e Archer et al. (1973) uma rápida clivagem das ligações peptídicas é observada durante o estágio inicial da reação de hidrólise, devido à rápida adsorção da enzima na superfície do substrato, levando à solubilização da proteína pela rápida clivagem das cadeias polipeptídicas, seguida por uma diminuição da velocidade resultado da competição entre o substrato original e os peptídeos produzidos durante a hidrólise.

Figura 1 – Grau de hidrólise dos diferentes hidrolisados proteicos obtidos



Hidrolisados proteicos de inseto congelado, obtidos com Alcalase (CA), inseto congelado, obtidos com Protamex (CP), inseto desidratado, obtidos com Alcalase (SA) e inseto desidratado, obtidos com Protamex (SP).

De acordo com a Figura 1, o hidrolisado proteico de barata cinérea seca com enzima Alcalase -SA apresentou o maior grau de hidrólise (GH) de cerca de 17,01%, em relação ao de barata cinérea congelada com enzima Alcalase – CA (11,34%), barata cinérea congelada com enzima Protamex – CP (6,54%), e barata cinérea o com enzima Protamex – SP (7,85%) com 260 min de hidrólise, respectivamente. A enzima e tipo da matéria-prima (barata cinérea congelada ou seca) influenciaram no GH obtido.

Hall et al. (2017) elaboraram hidrolisados proteicos de grilos (*Grylloides sigillatus*) descongelados utilizando a Alcalse (3%; enzima/substrato) como enzima e verificaram um GH de 52,4% em 90 min de hidrólise. Hall et al. (2018) também elaboraram hidrolisados proteicos a partir de grilos descongelados e obtiveram um GH variando de 50 a 85% com tempos de hidrólise de 20 a

80 min, respectivamente. A diferença verificada entre estes autores e o presente estudo, pode estar na composição química das matérias-primas, pois o grilo possui um conteúdo inferior de lipídios de cerca de 6,1% (base úmida), quando comparado com a barata cinérea congelada (8,1%; base úmida). Os lipídios dificultam a ação das enzimas sobre as proteínas, resultando em menor GH, respectivamente. Segundo Šližyte et al. (2005) a quantidade de lipídios na matéria prima influencia o processo de hidrólise, devido a que uma quantidade relativamente alta poderia formar complexos proteína/lipídeo, que pareceriam ser mais resistentes à quebra enzimática. Essas diferenças no GH observado neste estudo pode estar relacionado com o espécie de inseto utilizada e tipo de tratamento realizado na mesma (NONGONIERMA; FITZGERALD, 2017).

A barata cinérea seca apresenta um teor superior de carboidratos (19,0%; base seca), quando comparado com a barata cinérea congelada (14,4%; base seca), como verificado na Tabela 1. A quitina é um polissacarídeo que compreende o exoesqueleto de insetos (BERTELSEN et al., 2016), alguns estudos com insetos verificaram, que alguns podem conter cerca de 5,3 a 8,9% de quitina (massa seca) (KAYA et al., 2015; LUCAS et al., 2020). Segundo Van Dyken e Locksley (2018) a quitina é compostas de fibras mineralizadas de quitina-proteína, as quais podem ser clivadas internamente por enzimas, tais como as endoquitinases e nas extremidades por exoquitinases ou por enzimas não específicas como proteases. Contudo, esta característica da quitina, de uma estrutura altamente ordenada, dificulta o acesso das enzimas e reagentes ao substrato (POSHINA et al., 2018). Entretanto, no presente estudo os resultados sugerem que o teor de carboidratos não influenciou no GH obtido, respectivamente.

O desenvolvimento dos hidrolisados proteicos depende de fatores, tais como o tipo de enzima, substrato, pH da reação, temperatura, grau de hidrólise, tempo de hidrólise e proporção da enzima (CHALAMAIAH et al., 2012). Além disto, a especificidade das proteases afeta o tamanho, a quantidade, composição dos aminoácidos livres, tipo de peptídeos e suas sequências (ENNAAS et al., 2015). No presente estudo, verificou-se que a enzima Alcase, independentemente do substrato utilizado (barata cinérea seca ou congelada), apresentou os maiores GH em relação aos apresentados pela enzima Protamex. A Protamex é um mistura de enzimas (exo e endopeptidase) com diferentes tipos catalíticos de metalo protease, serina protease, protease aspártica entre outros. Nas proteases aspárticas e metalo proteases, por exemplo, o ataque nucleófilo é mediado por uma molécula de água, ativada por dois resíduos de ácido aspártico, um resíduo de ácido glutâmico e por um íon metálico, respectivamente (RAWLINGS et al., 2010). Entretanto, a Alcalase é uma serino protease, a qual não necessita de um íon metálico para a ativação do ataque nucleófilo como a Protamex (DAMODARAN et al., 2010), o que sugere maior eficiência na hidrólise. Além disto, a Alcalase é uma enzima que atua bem em uma faixa de pH 6,5 a 8,5, temperatura de 50 a 70 °C e (YUST et al., 2010) e a Protamex

a possui uma ótima atividade em pH de 7 à temperatura de 50 °C (WANG et al., 2014), o que pode ter influenciado no GH obtido porque o pH utilizado foi de 8,0 no presente estudo. Vercruysse et al. (2005) elaboraram hidrolisados proteicos a partir de traça (*Spodoptera littoralis*), bicho-se-seda (*Bombyx mori*), gafanhoto (*Schistocerca gregaria*) utilizando as enzimas, tais como as proteases gastrointestinais, Alcalase e termolisina onde verificaram que a enzima Alcalase apresentou os maiores GH em relação as demais enzimas. Segundo Yust et al. (2010) a Alcalase possui baixa especificidade, atuando bem em substratos com diferentes características, o que foi verificado no presente estudo.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROLISADOS PROTEICOS

A Tabela 2 apresenta o conteúdo de umidade e proteína dos diferentes hidrolisados elaborados. A barata cinérea congelada e barata cinérea seca resultaram em hidrolisados proteicos da Protamex com conteúdo significativamente superior ($p < 0,05$) de proteínas de 74,6% e 73,2% em relação aos demais hidrolisados elaborados. O alto teor de proteínas relatado para os hidrolisados proteicos ocorre devido à solubilização de proteínas durante a hidrólise e remoção de matéria sólida insolúvel por centrifugação (CHALAMIAH et al., 2012).

Tabela 2 – Conteúdo de umidade e proteínas dos diferentes hidrolisados

Componentes	CA	CP	SA	SP
Umidade (%)	4,2 ± 0,3 ^a	3,7 ± 0,1 ^{ab}	4,1 ± 0,2 ^a	3,2 ± 0,1 ^b
Proteína (base úmida) (%)	57,4 ± 0,9 ^c	71,9 ± 0,6 ^a	65,7 ± 0,8 ^b	70,8 ± 0,8 ^a
Proteína (base seca) (%)	59,9 ± 0,6 ^c	74,6 ± 0,4 ^a	68,6 ± 0,5 ^b	73,2 ± 0,3 ^a

Média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam que há diferença significativa ($p < 0,05$); Hidrolisado de inseto congelado utilizando a enzima Alcalase (CA), inseto congelado utilizando a enzima Protamex (CP), inseto seco utilizando a enzima Alcalase (SA) e inseto seco utilizando a enzima Protamex (SP).

Todas as amostras de hidrolisados proteicos de barata cinérea não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) em relação ao teor de umidade, com exceção do hidrolisado de barata cinérea congelada com enzima Protamex–CP, respectivamente. Apesar do GH nos diferentes hidrolisados, obtidos utilizando a enzima Alcalase serem superiores ao GH obtidos quando a Protamex foi utilizada, Figura 1, os hidrolisados CP e SP apresentaram um teor de proteínas solubilizadas significativamente superior ($p < 0,05$). Hall et al. (2017) verificou em seu estudo com hidrolisados proteicos de grilos (*Gryllodes sigillatus*) descongelados utilizando Alcalase com enzima, que a medida que aumentou o GH de 26,1% para 36,3% o conteúdo de proteínas diminuiu de 65,4% para 59,1%, respectivamente. Martins et al. (2009) verificou que os hidrolisados de corvina (*Micropogonias furnieri*) apresentaram

menor teor de proteínas para os hidrolisados com a Alcalase (47,09%) em comparação com a Flavourzyme, uma mistura de exo e endopeptidases, (50,15%) e um GH inversamente proporcional ao teor proteico, respectivamente. Segundo Zavareze et al. (2009) o hidrolisado proteico de cabrinha (*Prionotus punctatus*) utilizando a enzima Alcalase apresentaram menor teor proteico (87,84%) e maior GH em relação a Flavourzyme (92,39%), para um GH significativamente igual.

4 CONCLUSÃO

A partir deste estudo foi possível observar que tratamentos preliminares como a desidratação e o congelamento da matéria prima, influenciaram de maneira diferente a composição proximal de barata cinérea. Apesar de os insetos terem sido obtidos de diferentes criadouros e em fases diferentes de seu crescimento, acredita-se que a diminuição e o aumento dos teores de lipídios e proteínas para os diferentes tratamentos tenham sido causados principalmente devido às mudanças características que a secagem e o congelamento causam na matriz. Os hidrolisados de barata cinérea desidratada utilizando a enzima Alcalase apresentaram um grau de hidrólise superior ao verificado utilizando os mesmos substratos com a enzima Protamex. A Protamex é uma mistura de enzimas (exo e endopeptidase) com diferentes tipos catalíticos, nas quais o ataque nucleófilo é mediado por uma molécula de água, ativada por dois resíduos de ácido aspártico, um resíduo de ácido glutâmico e por um íon metálico, respectivamente. Entretanto, a Alcalase é uma serino protease, a qual não necessita de um íon metálico para a ativação do ataque nucleófilo como a Protamex, o que sugere maior eficiência na hidrólise. Contudo, apesar de apresentar maior grau de hidrólise para os diferentes substratos, a Alcalase apresentou após a hidrólise, o menor teor de proteínas, o que pode ter ocorrido devido a maior solubilização de proteínas durante a hidrólise e remoção de matéria sólida insolúvel por centrifugação utilizando esta enzima.

Financiamento: Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001 e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

ADLER-NISSEN, J. **Enzymatic hydrolysis of food proteins**. London: ElsevierApplied Science Publishing, 1986.

AOAC. Association of Official Analytical Chemistry. **Official Methods of analysis**. 17th ed. USA: Maryland, 2000.

ARCHER, M. C.; RAGNARSSON, J. O.; TANNENBAUM, S. R.; WANG, D. I. Enzymatic

solubilization of an insoluble substrate, fish protein concentrate: process and kinetic considerations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 15, p.181-196, 1973.

BERTELSEN, R. J.; SVANES, Ø.; MADSEN, A. M.; HOLLUND, B. E.; KIRKELEIT, J.; SIGSGAARD, T.; UHRBRAND, K., DO; T. V.; AASEN, T. B.; SVANES, C. Pulmonary illness as a consequence of occupational exposure to shrimp shell powder. **Environmental Research**, v. 148, p. 491-509, 2016

BRYKSA, B.C.; YADA, R. Y. Bioquímica de Alimentos. In: CAMPBELL-PLATT, G. (Ed.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Barueri - SP: Manole, 2015.

CASTRO, R. J. S.; OHARA, A.; AGUILAR, J. G. S.; DOMINGUES, M. A. F. Nutritional, functional and biological properties of insect proteins: Processes for obtaining, consumption and future challenges. **Trends in Food Science & Technology**, p. 82-89, v. 76, 2018.

CHALAMAIAH, M.; HEMALATHA, R.; JYOTHIRMAYI, T. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. **Food Chemistry**, v. 135, n. 4, p. 3020–3038, 2012.

CHUKWU, O. Influences of drying methods on nutritional properties of tilapia fish (*Oreochromis niloticus*). **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 5, p. 256–258, 2009.

ENNAAS, N.; HAMMAMI, R.; BEAULIEU, L.; FLISS, I. Purification and characterization of four antibacterial peptides from protamex hydrolysate of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) by-products. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 462, p. 195-200, 2015.

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

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

JANSSEN, R. H.; VINCKEN, J. P.; VAN DEN BROEK, L. A. M.; FOGLIANO, V.; LAKEMOND, C. M. M. Nitrogen-to-protein conversion factors for three edible insects: *Tenebrio molitor*, *Alphitobius diaperinus*, and *Hermetia illucens*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, p. 2275–2278, 2017.

KAYA, M.; ERDOGAN, S.; MOL, A., BARAN, T. Comparison of chitin structures isolated from seven Orthoptera species. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p.797–805, 2015.

KINYURU, J. N.; KENJI, G. M.; SIMON, N.; MUHOHO, M. A. Nutritional potential of longhorn grasshopper (*Ruspolia differens*) consumed in Siaya district, Kenya. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 12, p. 32–46, 2010.

LUCAS, A. J. S.; OLIVEIRA, L. M.; DA ROCHA, M.; PRENTICE, C. Edible insects: an alternative of nutritional, functional and bioactive compounds. **Food Chemistry**, v. 311, p. 126022, 2020.

LUCAS, A. J. S.; OLIVEIRA, L. M.; PRENTICE, C. Como os diferentes estágios do desenvolvimento interferem na composição proximal da barata cinérea (*Nauphoeta cinerea*). **Brazilian Journal of Development**, v. 5, p. 32510-32516, 2019.

MARTINS, V. G.; COSTA, J. A. V.; PRENTICE, C. Hidrolisado proteico de pescado obtido por vias química e enzimática a partir de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Química Nova**, v. 32, p.61-66, 2009.

MAZUR, P. Freezing of living cells: Mechanisms and implications. **American Journal of Physiology**, v. 247, p. C125–C142, 1984.

MELIS, R.; BRACA, A.; MULAS, G.; SANNA, R.; SPADA, S.; SERRA, G.; FADDA, M. L.; UZZAU, T. R. S.; ANEDDA, R. Effect of freezing and drying processes on the molecular traits of edible yellow mealworm. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 48, p. 138-149, 2018.

NAJAFIAN, L.; BABJI, A. S. A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: Their production, assessment, and applications. **Peptides**, v. 33, n. 1, p. 178–185, 2012.

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.

OLIVEIRA, L. M.; LUCAS, A. J. S.; CADAVAL, C. L. SALAS-MELLADO; M. M. Bread enriched with flour from cinereous cockroach (*Nauphoeta cinerea*). **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 2017.

PAYNE, C. L. R.; SCARBOROUGH, P.; RAYNER, M.; NONAKA, K. 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, 2015.

POSHINA, D. N.; RAIK, S. V.; POSHIN, A. N.; SKORIK, Y. A. Accessibility of chitin and chitosan in enzymatic hydrolysis: A review. **Polymer Degradation and Stability**, v. 156, p. 269-278, 2018.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; BATEMAN, A. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Research**, v. 38, p. D227–D233, 2010

SANTOS, D. S., CARVALHO, E. L., DE LIMA, J. C.; BREDAS, R. V.; OLIVEIRA, R. S.; FREITAS, T. C.; SALAMONI, S. D.; DOMINGUES, M. F.; PIOVESAN, A. R.; BOLDO, J. T.; ASSIS, D. R.; COSTA, J. C.; BELO, C. A. D.; PINTO, P. M. *Bothriurus bonariensis* scorpion venom activates voltage-dependent sodium channels in insect and mammalian nervous systems. **Chemico-Biological Interactions**, v. 258, p. 1-9, 2016.

SOSA, D. A. T.; FOGLIANO, V. Potencial of insect-derived ingredients for food applications. In: SCHIELDS, V. D. C. **Insect physiology and ecology**. InTech. 2017.

ŠLIŽYTE, R.; DAUKŠAS, E.; FALCH, E.; STORRØ, I., RUSTAD, T. Yield and composition of different fractions obtained after enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1415-1424, 2005.

VAN DYKEN, S. J.; LOCKSLEY, R. M. Chitins and chitinase activity in airway diseases. **Journal**

of Allergy and Clinical Immunology, v. 142, n. 2, p. 364-369, 2018.

VAN HUIS, A.; VAN ITTERBEECK, J.; KLUNDER, H.; MERTENS, E.; HALLORAN, A.; MUIR, G.; VANTOMME, P. Edible Insects. Future Prospects for Food and Feed Security. FAO: Rome, 201 p., 2013. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/018/i3253e/i3253e00.htm> Acesso em: 18/04/2018.

VERCRUYSSSE, L.; SMAGGHE, G.; HERREGODS, G.; VAN CAMP, J. ACE inhibitory activity in enzymatic hydrolysates of insect protein. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.53, p. 5207-5211, 2005.

WANG, X. J.; ZHENG, X. Q.; KOPPARAPU, N. K.; CONG, W. S.; DENG, Y. P.; SUN, X. J.; LIU, X. L. Purification and evaluation of a novel antioxidant peptide from corn protein hydrolysate. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 1562–1569, 2014.

YUST, M. D. M.; PEDROCHE, J.; DEL CARMEN MILLÁN-LINARES, M.; ALCAIDE-HIDALGO, J. M.; MILLÁN, F. Improvement of functional properties of chickpea proteins by hydrolysis with immobilised Alcalase. **Food Chemistry**, v. 122, p. 1212–1217, 2010.

ZAMORA-SILLERO, J.; TAVARES KÜTTER, M.; BORGES TESSER, M.; MONSERRAT, J. M.; PRENTICE, C. Effect of dietary common carp by-product protein hydrolysates on antioxidant status in different organs of zebrafish (*Danio rerio*). **Aquaculture Nutrition**, 2018. Doi: 10.1111/anu.12835

ZAVAREZE, E. D. R.; SILVA, C. M.; SALAS-MELLADO, M.; Prentice-Hernández, C. Funcionalidade de hidrolisados proteicos de cabrinha (*Prionotus punctatus*) obtidos a partir de diferentes proteases microbianas. **Química Nova**, v.32, p.1739-1743, 2009.

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, p. 306-312, 2017.