



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ANTÔNIO VICTOR BAIOCO VASCONCELOS

**OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS COM ATIVIDADES BIOLÓGICAS
OBTIDAS A PARTIR DAS VÍSCERAS DE TILÁPIA (*Oreochromis
spp.*)**

VITÓRIA

2025

ANTÔNIO VICTOR BAIOCO VASCONCELOS

**OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS COM ATIVIDADES BIOLÓGICAS
OBTIDAS A PARTIR DAS VÍSCERAS DE TILÁPIA (*Oreochromis
spp.*)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Martins Costa Santos.

VITÓRIA

2025

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

V331o Vasconcelos, Antonio Victor Baioco, 1991-
Obtenção de peptídeos com atividades biológicas obtidas a partir das vísceras de tilápia (*Oreochromis spp.*) / Antonio Victor Baioco Vasconcelos. - 2025.
101 f. : il.

Orientador: Alexandre Martins Costa Santos.
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Peptídeos. 2. Vísceras. 3. Antioxidantes. 4. Cromatografia a líquido. 5. Tilápia (Peixe). 6. Testes de toxicidade. I. Santos, Alexandre Martins Costa. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Ata da 36ª sessão de Defesa de Tese do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, do discente Antônio Victor Baioco Vasconcelos, realizada às treze horas do dia vinte e sete de junho de dois mil e vinte e cinco, tese intitulada “OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS COM ATIVIDADES BIOLÓGICAS A PARTIR DAS VÍSCERAS DE TILÁPIA (*Oreochromis spp*)”. A sessão pública foi realizada em formato virtual, por meio de videoconferência. O presidente da Banca, Prof. Dr. Alexandre Martins Costa Santos (orientador), apresentou os demais membros da comissão examinadora constituída pelos Doutores: Maria Aparecida Cicilini, membro titular externo ao programa que participou do Exame de Qualificação; Evandro Manoel Neto Neves, membro titular externo ao Programa; Kadima Nayara Teixeira, membro titular externo à UFES; Monique Lopes Ribeiro, membro titular externo à UFES. Em seguida, passou a palavra para o aluno que apresentou a sua proposta de Tese. Terminada a apresentação, a banca reuniu-se em separado e concluiu por considerar o doutorando **APROVADO** na defesa de Doutorado. Eu, Alexandre Martins Costa Santos, que presidi a Banca de defesa, assino a presente Ata, juntamente aos demais membros e dou fé. Vitória, 27 de junho de 2025.

Prof. Dr. Alexandre Martins Costa Santos - Orientadora
Universidade Federal do Espírito Santo

Profª Drª Maria Aparecida Cicilini – Membro titular externo
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Evandro Manoel Neto Neves – Membro titular externo
Universidade Federal do Espírito Santo

Profª Drª Kadima Nayara Teixeira – Membro titular externo
Universidade Federal do Paraná

Profª Drª Monique Lopes Ribeiro – Membro titular externo
Instituto Federal do Espírito Santo





UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
ALEXANDRE MARTINS COSTA SANTOS - SIAPE 1698543
Departamento de Ciências Fisiológicas - DCFI/CCS
Em 30/06/2025 às 18:08

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link: <https://api-lepisma.prod.ukf.ufes.br/arquivos-assinados/1156665?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
EVANDRO MANOEL NETO NEVES - SIAPE 3248348
Departamento de Ciências Fisiológicas - DCFI/CCS
Em 30/06/2025 às 18:19

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link: <https://api-lepisma.prod.uks.ufes.br/arquivos-assinados/1156670?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
MARIA APARECIDA CICILINI - SIAPE 296983
Departamento de Ciências Fisiológicas - DCFI/CCS
Em 01/07/2025 às 12:11

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link: <https://api-lepisma.prod.ukf.ufes.br/arquivos-assinados/1157078?tipoArquivo=O>

ANTÔNIO VICTOR BAIOCO VASCONCELOS

Obtenção de peptídeos com atividades biológicas obtidas a partir das vísceras de tilápia (*Oreochromis spp.*)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Prof. Dr. Alexandre Martins Costa Santos
Universidade Federal do Espírito Santo
(Orientador)

VITÓRIA

2025

AGRADECIMENTOS

A UFES, por proporcionar ensino e pesquisa de qualidade gratuitamente.

Aos meus pais, Antônio e Maria Helena (*in memoriam*), aos quais dedico todas as conquistas da minha vida com a mais profunda admiração e respeito. Ao meu irmão, Herbert, companheiro de vida, obrigado pelos conselhos, risos e incentivos.

Ao meu orientador, Dr. Alexandre Martins Costa Santos, pelas oportunidades de aprendizado oferecidas desde a graduação. O seu incentivo, sua gigante paciência, amizade e compreensão foram fundamentais para a realização desta tese e contribuíram enormemente para o meu amadurecimento profissional.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Kádima Nayara Teixeira, Dra. Monique Lopes Ribeiro, Dra. Maria Aparecida Cicilini, Dr. Evandro Manoel Neto Neves, Dra. Rita Gomes Wanderley Pires e Dr. Marlonni Maurastoni Araujo, por aceitarem avaliar esta tese, aperfeiçoando o trabalho com seus conhecimentos e sugestões.

Gostaria de expressar minha sincera gratidão aos colegas e amigos que contribuíram de maneira significativa durante minha passagem pelo Laboratório de Bioquímica e Biofísica Molecular de Proteínas: Dayanne, Evaldo, Fabiano, Maribel, Marielly, Matheus, Monique, Isabella, Ivis, Konrad, Andressa, Aurélio, Daniel, Paulo Arthur, Anna Clara, Silvana, Gabriela, Erick e Juliana. Agradeço pela companhia, assistência, aprendizado compartilhado e apoio, além das valiosas discussões e trocas de conhecimento.

Aos técnicos e professores do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, do departamento de ciências fisiológicas e LABIOM/UFES, pelo ensino e auxílio para a realização deste trabalho e o convívio nestes anos.

Ao LABIOM/UFES (Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares da Universidade Federal do Espírito Santo), pela utilização dos equipamentos necessários para a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio (LBAA), e em especial à Professora Dra. Patrícia M. B. Fernandes e Dr. Alberto Ribeiro Fernandes pelo uso do laboratório.

Ao Laboratório de Ecologia Microbiana do Ifes Piúma, em especial à Professora Dra. Flávia Regina Spago pelo uso do laboratório.

Ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia, pela oportunidade de realizar o doutorado e pela minha formação acadêmica.

A CAPES (Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa concedida, ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e FAPES (Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo), pelo apoio financeiro a esta pesquisa.

A estes e a todos que não foram citados acima, mas que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

VASCONCELOS. A.V.B. **Obtenção de peptídeos com atividades biológicas obtidas a partir das vísceras de tilápia (*Oreochromis spp.*)** 2025. 101f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) — Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES. Espírito Santo. Brasil.

RESUMO

A produção intensiva de tilápia (*Oreochromis spp.*) no Brasil gera grande volume de resíduos, como vísceras, que apresentam elevado conteúdo proteico e potencial para aproveitamento biotecnológico. Este estudo teve como objetivo obter, fracionar e caracterizar peptídeos bioativos a partir das vísceras de tilápia, com ênfase em suas atividades antioxidante, antimicrobiana e toxicológica, alinhando-se aos princípios da economia circular e sustentabilidade. As proteínas foram extraídas utilizando solventes orgânicos, seguidas de dessalinização por cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G-25) e fracionamento por cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G-50), resultando em sete frações peptídicas (F1 a F7). A atividade antioxidante foi avaliada pelo método ABTS^{•+}, utilizando Trolox como padrão. As frações F4, F5 e F6 demonstraram as maiores atividades antioxidantes (1933,4; 1520,5 e 1546,7 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em equivalentes de Trolox, respectivamente), sugerindo presença de peptídeos de baixo peso molecular e com resíduos de aminoácidos funcionalmente ativos, como tirosina, triptofano e histidina. A toxicidade das frações foi analisada em larvas de *Tenebrio molitor*, modelo alternativo que atende aos princípios dos 3Rs. As frações foram injetadas em três doses (10, 40 e 80 μg), com monitoramento da mortalidade ao longo de 120 horas. A análise estatística por modelo linear generalizado (GLM binomial) indicou efeitos dose-dependentes e tempo-dependentes. As frações F4, F5 e F6 apresentaram maior toxicidade (mortalidade \geq 93,3 % a 80 μg), enquanto a fração F2 foi a menos tóxica, com mortalidade inferior a 40 % mesmo na maior dose. Em contrapartida, nenhuma das frações demonstrou atividade antimicrobiana detectável contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* no ensaio de difusão em disco. Tal resultado pode estar relacionado à ausência de peptídeos com atividade antimicrobiana ou à limitação do método frente a compostos de baixo coeficiente de difusão. Conclui-se que as vísceras de tilápia são uma fonte promissora de peptídeos com atividade antioxidante, especialmente nas frações F4, F5 e F6. A triagem toxicológica com *T. molitor* demonstrou ser eficaz para avaliação preliminar de toxicidade. Os resultados obtidos reforçam o potencial da biotecnologia para a valorização de resíduos pesqueiros e o desenvolvimento de novos ingredientes funcionais com aplicações industriais.

Palavras-chave: Peptídeos bioativos, Vísceras de tilápia, Atividade antioxidante, cromatografia, atividade toxicológica.

ABSTRACT

Vasconcelos. A.V.B. **Extraction of peptides with biological activities obtained from tilapia viscera (*Oreochromis spp.*)**. 2025. 101p. Thesis (Doctorate in Biotechnology) — Graduate Program in Biotechnology, Federal University of Espírito Santo (UFES), Espírito Santo, Brazil.

The intensive production of tilapia (*Oreochromis spp.*) in Brazil generates large volumes of organic waste, particularly viscera, which are rich in proteins and enzymes and hold biotechnological potential. This study aimed to obtain, fractionate, and characterize bioactive peptides from tilapia viscera, with an emphasis on antioxidant, antimicrobial, and toxicological activities, in alignment with principles of circular economy and sustainable development. Proteins were extracted using organic solvents, desalted by molecular exclusion chromatography (Sephadex G-25), and fractionated by molecular exclusion chromatography (Sephadex G-50), yielding seven peptide fractions (F1 to F7). The antioxidant activity was evaluated by the ABTS•⁺ radical scavenging assay, using Trolox as the standard. Fractions F4, F5, and F6 showed the highest antioxidant capacities (1933.4; 1520.5; and 1546.7 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Trolox equivalents, respectively), suggesting the presence of low molecular weight peptides enriched in amino acid residues such as tyrosine, tryptophan, and histidine. Toxicological evaluation was performed using larvae of *Tenebrio molitor* as an alternative in vivo model in compliance with the 3Rs principles. The fractions were injected at three different concentrations (10, 40, and 80 μg), and larval survival was monitored over 120 hours. A binomial generalized linear model (GLM) indicated dose- and time-dependent toxicity. Fractions F4, F5, and F6 were the most toxic (≥ 93.3 % mortality at 80 μg), while F2 showed the lowest toxicity, with mortality remaining below 40 % even at the highest dose. Conversely, none of the peptide fractions exhibited detectable antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, or *Pseudomonas aeruginosa* under the disc diffusion assay, possibly due to the absence of bactericidal peptides or limitations in compound diffusion through the agar matrix. In conclusion, the tilapia viscera represent a promising source of antioxidant peptides, with fractions F4, F5, and F6 standing out as candidates for further development. The use of *T. molitor* proved to be a viable alternative model for preliminary toxicity screening. These findings support the valorization of aquaculture by-products as

bioactive resources and provide a foundation for developing functional ingredients for the food, pharmaceutical, or cosmetic industries.

.

Keywords: Bioactive peptides; Tilapia viscera; Antioxidant activity; Chromatography; Toxicological activity.

LISTA DE FOTOGRAFIAS

Fotografia 1 — Tilápia em processo de captura.....	23
--	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 — Cromatografia de exclusão molecular do extrato proteico bruto de vísceras de tilápia.	42
Gráfico 2 — Cromatografia de exclusão molecular do extrato proteico dessalinizado de vísceras de tilápia.....	46
Gráfico 3 — Representação gráfica das regiões de separação de cada fração do Gráfico 2.	47
Gráfico 4 — Curva de calibração de Trolox.	50
Gráfico 5 — Atividade antioxidante total das frações F1 a F7, expressa em equivalentes de Trolox ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 — Rendimento das extrações das vísceras de tilápia	40
Tabela 2 — Mortalidade acumulada (%) de <i>T. molitor</i> em diferentes tempos (24 a 120 h) após aplicação de frações em três concentrações (10, 40 e 80 µg).	55
Tabela 3 — Resultados significativos das estimativas dos coeficientes do modelo de regressão logística binomial (GLM) para a mortalidade de <i>T. molitor</i> em função da dose ('dose (µg)'), tempo ('horas') e interações com as frações, utilizando a amostra controle como referência.	63
Tabela 4 — Estimativas dos parâmetros do modelo de regressão logística binomial (GLM) para a mortalidade acumulada de <i>T. molitor</i> , considerando os efeitos principais e as interações entre fração, dose (µg) e tempo (horas).	65
Tabela 5 — Diâmetros dos halos de inibição (mm) de discos embebidos em diferentes frações peptídicas e dispostos em placas inoculadas com diferentes patógenos.	76
Apêndice A — Resultados significativos e não significativos das estimativas dos coeficientes do modelo de regressão logística binomial (GLM) para a mortalidade de <i>T. molitor</i> em função da dose (µg), tempo (horas) e interações com os extratos, utilizando a amostra controle como referência.	96

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 — Letras de agrupamento estatístico obtidas por teste de comparações múltiplas de Tukey ($p < 0,05$) aplicadas às médias de mortalidade acumulada de <i>T. molitor</i> por fração e tempo (24 a 120 h).	71
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus celsius.
$\mu\text{g}\cdot\text{disco}^{-1}$	Micrograma por disco.
μL	Microlitro.
$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Micromol por litro.
Abs	Absorbância.
ABTS	ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (Coleção Americana de Culturas-Tipo)
CNI	Confederação Nacional da Industria
Da	Dalton
DHA	Ácido Docosahexaenoico
DNOCS	Departamento Nacional de Obras Contra as Secas.
EPA	Ácido Eicosapentaenoico
$\text{fios}\cdot\text{cm}^{-2}$	Fios por centímetro quadrado.
G	Força centrífuga relativa.
GLM	Modelo linear generalizado
IFES	Instituto Federal do Espírito Santo

$K_2P_2O_8$	Persulfato de pótassio
kDa	Kilodalton.
LABIOM/UFES	Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares da Universidade Federal do Espírito Santo.
LBAA	Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio
LBBMP	Laboratório de Bioquímica e Biofísica Molecular de Proteínas
$m \cdot v^{-1}$	Massa por volume.
$mg \cdot L^{-1}$	Miligrama por litro.
$mg \cdot mL^{-1}$	Miligrama por mililitro.
Min	Minuto
$mL \cdot min^{-1}$	Mililitro por minuto.
$mmol \cdot mL^{-1}$	Milimol por mililitro.
$mS \cdot cm^{-1}$	Milisiemens por centímetro.
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
Nm	Nanômetros.
$p \cdot v^{-1}$	Peso por volume $p \cdot v^{-1}$
PA	Padrão analítico

rpm	Rotações por minuto.
<i>Trolox</i>	Ácido (±)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico
ufc·mL ⁻¹	Unidades formadoras de Colônias por mililitro.
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. CONTEXTO ECONÔMICO SOCIAL	21
1.2. A TILÁPIA.....	22
1.3. PEPTÍDEOS BIOATIVOS	25
1.4. ANÁLISE TOXICOLÓGICA	26
1.5. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	27
2. HIPÓTESE E JUSTIFICATIVA	29
2.1. HIPÓTESE	29
2.2. JUSTIFICATIVA	29
3. OBJETIVOS.....	31
3.1. OBJETIVO GERAL.....	31
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1. MATERIAIS.....	32
4.2. COLETA E PREPARO DE AMOSTRA	32
4.3. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA.....	33
4.4. DESSALINIZAÇÃO DO EXTRATO PROTÉICO BRUTO POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR.....	34
4.5. CROMATOGRAFIA POR GEL FILTRAÇÃO PARA A SEPARAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS	34
4.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL DAS FRAÇÕES CROMATOGRÁFICAS	35
4.7. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DOS EXTRATOS EM <i>TENEBRIO MOLITOR</i>	36
4.7.1. Análise estatística dos dados.....	37
4.8. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	40
5.1. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS	40
5.2. DESSALINIZAÇÃO DO EXTRATO PROTÉICO BRUTO	41
5.3. CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR PARA SEPARAÇÃO DAS BIOMOLÉCULAS.	44
5.4. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL	49

5.5. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DAS FRAÇÕES CROMATOGRAFICAS EM TENEBRIO MOLITOR	54
5.6. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	75
5.7. INTEGRAÇÃO DOS RESULTADOS: CORRELAÇÃO ENTRE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E TOXICIDADE	78
6. CONCLUSÃO	80
7. REFERÊNCIAS	82
APÊNDICE	96

1. INTRODUÇÃO

1.1. Contexto econômico social

O Brasil produziu em 2024 662 mil toneladas de tilápia (*Oreochromis spp.*), representando 68 % de toda a produção da piscicultura cultivada nacional (Peixe BR, 2025). Ao todo, a produção nacional de pescados cultivados foi de 968,7 mil toneladas, fazendo o país o quarto produtor mundial de tilápia (Peixe BR, 2025). Em 2024, o estado do Espírito Santo foi o 16º maior produtor de tilápia a nível nacional, com 20,4 mil toneladas cultivadas (Peixe BR, 2025). Tendo em vista a grande produção de peixes, estima-se a grande quantidade de resíduos pesqueiros produzidos, já que entre 50 e 70 % se tornem resíduos (Olsen; Toppe; Karunasagar, 2014).

O conceito de economia circular propõe uma mudança nos impactos causados pelo homem ao meio ambiente (Braungart, 2013; Braungart; McDonough; Bollinger, 2007; Reike; Vermeulen; Witjes, 2018), dando ao resíduo um papel principal na sua reutilização e na mitigação de desperdícios. Sob este olhar, os resíduos retornam ao ciclo produtivo convertendo-se em uma nova matéria-prima para formar novos produtos tecnológicos, fechando, assim, o ciclo de produção (Reike; Vermeulen; Witjes, 2018). Ao se adotar este tema, espera-se o crescimento sustentável da economia por intermédio do surgimento de novas empresas e oportunidades de empregos, da economia do custo da matéria-prima e da redução dos impactos ambientais (Kalmykova; Sadagopan; Rosado, 2018).

Devido os altos custos de tratamento de efluentes e dos resíduos industriais, soluções que minimizem o descarte como a reciclagem e reuso, promovendo uma produção mais limpa, transforma-se em benefícios às indústrias, pois reduz ou sana os problemas gerados pelos descartes destes resíduos, como a redução no consumo de água e energia, redução na geração de efluentes e na redução de custos de tratamentos de efluentes, além de agregar valor ao que antes não possuía (Felttes *et al.*, 2010; Miliute-Plepiene, 2007). Além disto, a empresa ao aderir a um processo de produção limpa, apresenta um aumento na competitividade, devido às ações

ecológicas favorecerem ao marketing ambiental, dando a esta indústria uma imagem positiva perante os consumidores e à comunidade, tendo assim um destaque em relação às suas concorrentes que adotam o método tradicional (Ene *et al.*, 2013). Como exemplo de aproveitamento dos resíduos gerados estão a utilização em ração animal, produção de fertilizantes, bioprodutos, enzimas, substâncias químicas, óleos, biodiesel (Aguiar; Limberger; da Silveira, 2014).

O assunto sustentabilidade e economia verde já está afetando o planejamento e negócios das empresas no Brasil. Em pesquisa da Confederação Nacional da Indústria (CNI), no ano de 2022, a executivos de 1004 empresas industriais de pequeno, médio e grande porte mostra que 59 % das empresas possuem um estrutura formal para lidar com o assunto sustentabilidade; 38 % das empresas tem como prioridade reduzir a geração de resíduos sólidos na produção; 45 % das empresas exigem algum certificado dos seus fornecedores e/ou parceiros de cumprimentos de critérios ambientais para a contratação ou compra de produtos e insumos e 84 % das empresas já deixaram de vender algum produto por não ter alguma certificação ou seguir algum requisito ambiental em sua cadeia produtiva (CNI, 2022). Assim, é esperado que este tema tende a ganhar mais espaço e vire um fator decisório nas tomadas de decisões pelas empresas, pelo governo e pela sociedade.

1.2. A tilápia

A tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) (Fotografia 1) pertence à família Cichlidae (ordem Cichliformes), grupo de peixes perciformes conhecidos por sua diversidade adaptativa em ambientes tropicais (Trewavas, 1983). Nativa da África e Oriente Médio, foi introduzida no Brasil na década de 1970 pelo Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS), em 1971. Os primeiros espécimes foram introduzidos pelo DNOCS com o intuito de proporcionar a produção de alevinos para o peixamento (espécie de repovoamento) dos reservatórios públicos da região Nordeste, para o fomento do cultivo e para controle biológico de mosquitos vetores de dengue e malária (Pickler *et al.*, 2017). Contudo, sua proliferação descontrolada em reservatórios como Itaipu (PR) e Três Marias (MG) levou à classificação como espécie invasora (Agostinho; Vitorino Júnior; Pelicice, 2018).

Fotografia 1 — Tilápia em processo de captura



Fonte: (BRASIL, 2022).

A tilápia é a espécie mais cultivada na aquicultura brasileira, responsável por 68 % da produção nacional (Peixe BR, 2025). Seu sucesso deve-se a características como: (I) Rusticidade: Tolerância a variações de pH (3,7–11,0), oxigênio dissolvido (acima de 0,1 mg/L), amônia (até 7,1 mg·L⁻¹) e temperatura (8–42°C) (Abd El-Hack *et al.*, 2022; Mjoun; Rosentrater; Brown, 2010). (II) Ciclo de vida curto: Alcança peso comercial (800g) em 6–8 meses (Borges, 2009).

A tilápia exibe uma dieta onívora com tendência herbívora, consumindo fitoplâncton, macroalgas e detritos orgânicos (Borges, 2009). Seu trato digestivo inclui um estômago ácido (pH 1.4–2.5) e intestino curto, onde enzimas como pepsina, tripsina e lipase pancreática garantem eficiência metabólica (Montoya-Mejía; Rodríguez-González; Nolasco-Soria, 2016; Rotta, 2003).

O corpo fusiforme da tilápia, com comprimento médio de 30–40 cm, é adaptado para natação rápida em ambientes lotados. Sua coloração varia de acinzentada a esverdeada, com nadadeiras dorsais e caudais robustas. A epiderme é recoberta por muco rico em glicoproteínas. Ela reduz o atrito do animal com a água e confere ainda proteção, impedindo a entrada de agentes infecciosos (Moro *et al.*, 2013).

A tilápia é reconhecida por seu perfil nutricional equilibrado, sendo uma fonte acessível de proteínas de alto valor biológico, lipídios saudáveis e minerais essenciais. A carne contém 13–25 % de proteína, com todos os aminoácidos essenciais (Hernández-Sánchez; Aguilera-Morales, 2012). Comparada a outras espécies, como o salmão (18–24 % de proteína) e o bacalhau (18–21 %), a tilápia apresenta um teor proteico competitivo, aliado a um baixo teor lipídico (1,5–3 %), composto principalmente por ácidos graxos omega-6 (60 %), como o ácido linoleico (C18:2n6), e omega-3 (5–8 %), como Ácido Eicosapentaenoico (EPA) e Ácido Docosaheptaenoico (DHA) (Hernández-Sánchez; Aguilera-Morales, 2012; Marques; Botelho; Guiné, 2019; Sprague *et al.*, 2020).

Os resíduos de processamento oferecem ainda maior potencial nutricional:

- Vísceras: Contêm 18–25 % de proteína bruta e enzimas digestivas (tripsina, quimotripsina), além de ácidos graxos polinsaturados (Hernández-Sánchez; Aguilera-Morales, 2012; Montoya-Mejía; Rodríguez-González; Nolasco-Soria, 2016).
- Escamas: Ricas em colágeno tipo I (30–40 %) e hidroxiapatita, com aplicações em biomateriais para regeneração óssea (Melo, 2024; Moro *et al.*, 2013)
- Pele: Fonte de gelatina termoestável (força de gel 250–300 Bloom), utilizada em cápsulas farmacêuticas e filmes comestíveis (Melo, 2024; Moro *et al.*, 2013).
- Ossos: Farinha rica em cálcio (15–20 %) para fortificação de alimentos (Hemung, 2013).

A economia circular na cadeia da tilápia envolve o aproveitamento integral de todos os subprodutos. A carne mecanicamente separada é processada em surimi,

hambúrgueres e embutidos (Fogaça *et al.*, 2015). A pele, hidrolisada por métodos enzimáticos, produz peptídeos antioxidantes com aplicações em nutracêuticos (Ma *et al.*, 2022), além de ser utilizada como um curativo oclusivo para tratamentos de queimaduras (Lima Verde *et al.*, 2021). As Escamas processadas via tratamento alcalino, rendem hidroxiapatita e biocompostos de gelatina (Melo, 2024). Já o tratamento ácido, rendem diferentes tipos de colágenos (Chen, Junde *et al.*, 2016; El-Rashidy *et al.*, 2015; Zakaria; Bakar, 2015). Os ossos e cabeça, triturados e desengordurados, produzem farinha utilizados para a indústria alimentícia em geral, com ênfase na panificação (Akullo; Kigozi; Muyonga, 2020; Fong-in *et al.*, 2020; Monteiro *et al.*, 2018). As vísceras: Submetidas a hidrólise, produzem biocompostos que apresentam atividade anti-hipertensiva, redutora do estresse oxidativo e diminuição do dano renal (Riyadi *et al.*, 2021, 2020).

1.3. Peptídeos bioativos

Peptídeos bioativos são fragmentos proteicos capazes de exercer efeitos fisiológicos específicos nos sistemas biológicos (Kitts; Weiler, 2003). São formados por 2 a 20 resíduos de aminoácidos (Möller *et al.*, 2008). A liberação desses peptídeos pode ocorrer naturalmente durante a digestão ou por meio de processos controlados, como hidrólise enzimática ou fermentação. Uma vez obtidos, esses compostos podem atuar como agentes antioxidantes, antimicrobianos, imunomoduladores, anti-inflamatórios e anti-hipertensivos, dependendo de sua sequência e conformação estrutural (Sánchez; Vázquez, 2017). Seu mecanismo de ação varia conforme a função: antioxidante, antimicrobiano, antitrombótico, anti-hipertensivo, opioide e imunomodulador (Sánchez; Vázquez, 2017). A composição e a sequência dos aminoácidos determinam a atividade dos peptídeos uma vez que são liberados da proteína precursora onde estão criptografados. Geralmente, eles são obtidos através da hidrólise enzimática, fermentação microbiana e síntese química (Sánchez; Vázquez, 2017). Devido a essas propriedades, os peptídeos bioativos despertam grande interesse nas indústrias de alimentos funcionais, farmacêutica e cosmética, sendo considerados ingredientes-chave no desenvolvimento de produtos com alegações de saúde e alto valor agregado (Haque; Chand; Kapila, 2008; Lemes *et al.*, 2016; Moldes; Vecino; Cruz, 2017).

1.4. Análise toxicológica

A análise toxicológica é um componente essencial na avaliação da segurança de substâncias químicas, extratos biológicos e compostos farmacêuticos, sendo tradicionalmente realizada em modelos vertebrados (Gusain; Sharma; Dixit, 1994; Hamed; El-Sayed, 2019; Saoudi *et al.*, 2008; Zhang, Jiahui *et al.*, 2024). No entanto, a crescente demanda por métodos éticos, sustentáveis e economicamente viáveis tem impulsionado a adoção de modelos alternativos, que adotem o conceito dos 3Rs — *Replacement* (Substituição), *Reduction* (Redução) e *Refinement* (Refinamento), propostos por Russel e Burch, (1959), são princípios fundamentais que foram propostos para conduzir o uso de animais em pesquisas éticas, testes ou educacional, visando minimizar o sofrimento animal e promover práticas mais humanas e responsáveis na pesquisa biomédica. (Aske; Waugh, 2017; Törnqvist *et al.*, 2014), sendo hoje adotado como um conceito chave para o uso humano em pesquisas em legislações de importantes nações, inclusive do Brasil (Törnqvist *et al.*, 2014). Entre estes modelos alternativos, se destaca o uso do inseto *Tenebrio molitor*, conhecido como larva de tenébrio, um inseto terrestre, cujo a larva é largamente utilizada para a alimentação de animais, como aves. Esse organismo oferece diversas vantagens como modelo experimental: possui fácil manejo, baixo custo de manutenção, desenvolvimento rápido e ausência de barreiras éticas rigorosas (Sun *et al.*, 2025). Trabalhos anteriores já utilizaram este modelo de estudo para o estudo de toxicidade repelentes (Buneri *et al.*, 2019), microplásticos (Ding *et al.*, 2024), nanoplásticos (Sun *et al.*, 2025), micotoxinas (Janković-Tomanić *et al.*, 2024, 2019) e medicamentos (Braga *et al.*, 2024). O seu uso permite apresentar respostas fisiológicas e imunológicas conservadas que permitem a extrapolação preliminar de dados toxicológicos (Brai *et al.*, 2023). Estudos demonstram que a aplicação de substâncias tóxicas em *T. molitor* — seja por injeção, ingestão ou contato — pode desencadear respostas mensuráveis, como mortalidade, alterações comportamentais, variações morfológicas e marcadores bioquímicos de estresse oxidativo ou inflamação, podendo imitar muitos dos aspectos das respostas que os mamíferos teriam ao agente tóxico (Braga *et al.*, 2024; Brai *et al.*, 2023; Sun *et al.*, 2025) .

1.5. Atividade antioxidante

Diversos ensaios foram introduzidos para a medida de ensaios de atividade antioxidantes totais de fluidos corporais (Miller *et al.*, 1993; Whitehead; Thorpe; Maxwell, 1992), extratos alimentícios (Rice-Evans; Miller, 1995; Salah *et al.*, 1995; Wang; Cao; Prior, 1996) e compostos puros (Kono *et al.*, 1995; Miller *et al.*, 1993). Cada método relata a geração de um radical diferente, atuando sobre uma variedade de mecanismos. A geração do radical catiônico ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), $ABTS^{•+}$), constitui a base de um dos métodos que tem sido aplicado à medição da atividade antioxidante total de soluções de substâncias puras, misturas aquosas e bebidas. O ensaio original utilizando $ABTS^{•+}$ foi baseado na ativação da metamioglobina com peróxido de hidrogênio na presença de ABTS para produzir o radical catiônico, na ausência ou presença de um antioxidante (Scott *et al.*, 1993). Este método sofreu críticas devido que a rápida reação antioxidante também poderia contribuir para a redução da mioglobina. Assim, estudos levaram a ensaios que possuíssem técnicas de descoloração utilizando um radical gerado estável antes da reação com agentes antioxidantes. A técnica melhorada para a geração do radical $ABTS^{•+}$ utilizada neste trabalho, envolve a utilização de um cromóforo de $ABTS^{•+}$ que surge após a reação com persulfato de potássio (Re *et al.*, 1999). Neste ensaio, o radical $ABTS^{•+}$ de coloração azul/verde é convertido de volta a sua forma neutra (ABTS) incolor. Esses resultados são comparados aos realizados com ao padrão Trolox (Ácido (\pm) -6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico), um análogo da vitamina D, fornecendo as amostras analisadas uma comparação do seu "poder antioxidante" (Van Den Berg *et al.*, 1999).

Para tentar se inserir nas mudanças econômicos-sociais provocadas pela maior preocupação da sociedade em relação ao meio ambiente, o Laboratório de Bioquímica e Biofísica Molecular de Proteínas (LBBMP) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) juntamente com o Laboratório de Processamento de Pescado e o Laboratório de Análise de Alimentos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo (IFES) - campus Piúma, vem buscando alternativas de inovar e atender a estas demandas dentro de sua área de conhecimento. O LBBMP atua principalmente na caracterização e estabilização de proteínas e enzimas de origem agrícola (bovina e pesqueira) com interesse industrial. Embora atue a apenas

5 anos com o estudo pesqueiro, o grupo apresenta pesquisas já públicas em obtenção de enzima lipase provenientes de tilápias e compostos bioativos provenientes de vísceras de peroá (*Balistes capriscus*). Assim, a busca por inovação estimulou o início das atividades de pesquisas para a obtenção de compostos bioativos provenientes de vísceras de tilápia.

2. HIPÓTESE E JUSTIFICATIVA

2.1. HIPÓTESE

Se o processo de extração e fracionamento de peptídeos a partir de vísceras de tilápia (*Oreochromis spp.*) for otimizado para enriquecer frações com atividade antioxidante significativa, então os peptídeos mais potentes nessas frações serão majoritariamente associados a componentes que exibem alta toxicidade, exigindo, conseqüentemente, que etapas adicionais de purificação seletiva ou estratégias de modificação molecular sejam empregadas para a viabilização de produtos bioativos seguros e economicamente competitivos.

2.2. JUSTIFICATIVA

O crescente interesse global por soluções inovadoras em saúde, nutrição e bem-estar tem impulsionado a prospecção de biomoléculas bioativas a partir de fontes naturais. Neste cenário, a valorização de subprodutos industriais, frequentemente descartados, emerge como uma estratégia inteligente e sustentável. O presente projeto justifica-se pela convergência do notável potencial biotecnológico intrínseco aos resíduos da aquicultura, com a premente necessidade de adoção de práticas de economia circular e a busca por um selo verde que ateste o compromisso ambiental.

A tilápia (*Oreochromis spp.*) é uma das espécies de peixe mais cultivadas mundialmente, gerando volumes substanciais de vísceras – um resíduo atualmente subutilizado. Essa biomassa, conforme estimativas e dados preliminares da literatura, é uma fonte potencialmente rica em proteínas e peptídeos, que podem ser transformados em produtos de alto valor agregado. A ineficiência do descarte atual gera um passivo ambiental considerável e um desperdício de recursos que poderiam ser reintegrados na cadeia produtiva. O potencial biotecnológico das vísceras reside na sua composição bioquímica. Peptídeos derivados de fontes aquícolas são amplamente reconhecidos na literatura por sua diversidade de atividades biológicas, incluindo propriedades antioxidantes, antimicrobianas, anti-hipertensivas, entre outras. A exploração desses compostos oferece uma oportunidade única de desenvolver ingredientes funcionais para as indústrias alimentícia, farmacêutica e

cosmética, agregando valor a um material de baixo custo. A abordagem proposta alinha-se perfeitamente aos princípios da economia circular. Ao invés de tratar as vísceras de tilápia como um efluente, este projeto busca redefini-las como uma valiosa matéria-prima. Essa estratégia não apenas contribui para a minimização do impacto ambiental do setor aquícola, mas também fomenta a criação de novas cadeias de valor, promovendo a sustentabilidade e a eficiência no uso de recursos. A transformação de resíduos em coprodutos valiosos confere um "selo verde" intrínseco ao processo e aos futuros produtos derivados.

Finalmente, a competência do laboratório para conduzir esta pesquisa é um diferencial fundamental. Nosso grupo de pesquisa possui expertise consolidada e infraestrutura adequada em bioquímica de proteínas e peptídeos, abrangendo desde metodologias de extração e purificação de macromoléculas (como cromatografia de exclusão molecular) até a avaliação de diversas atividades biológicas. Essa experiência prévia e o conhecimento técnico garantem a capacidade de abordar os desafios inerentes à prospecção, fracionamento e caracterização de biomoléculas complexas, assegurando a robustez metodológica e a credibilidade dos resultados a serem gerados.

Em síntese, a realização deste projeto é estrategicamente justificada pela oportunidade de converter um resíduo abundante em uma fonte de inovação biotecnológica, contribuindo para a sustentabilidade e a bioeconomia, e sendo plenamente viável pela experiência e recursos do nosso grupo de pesquisa.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Investigar o potencial biológico de peptídeos obtidos a partir das vísceras de tilápia (*Oreochromis spp.*), por meio de extração, fracionamento e caracterização de suas propriedades antioxidantes, toxicológicas e antimicrobianas.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair proteínas e peptídeos das vísceras de tilápia utilizando métodos baseados em solventes orgânicos;
- Obter um extrato bruto dessalinizado;
- Obter frações proteicas provenientes do extrato bruto;
- Avaliar a atividade antioxidante total das frações obtidas pelo ensaio ABTS;
- Investigar o perfil toxicológico das frações em larvas de *Tenebrio molitor*;
- Analisar a atividade antimicrobiana das frações frente a cepas padrão de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*;
- Relacionar os dados biológicos obtidos com as características físico-químicas e possíveis estruturas dos peptídeos presentes nas frações.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

Da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA) foram adquiridos: ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) e Ácido (\pm)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox). A água reagente Tipo I foi purificada com um sistema de água Barnstead nanopure Diamond Ultrapure (Barnstead International, Dubuque, EUA). Da Synth (Diadema, BRA) foi adquirido: ácido clorídrico (HCl). Da Vetec (Duque de Caxias, BRA) foram adquiridos: hidróxido de sódio (NaOH). Da Dinâmica (Indaiatuba, BRA) foram adquiridos: acetona Padrão Analítico (PA), etanol PA, persulfato de potássio ($K_2P_2O_8$) e cloreto de sódio (NaCl). Da Animalia&Cia (Esmeraldas, Brasil) foram adquiridas as larvas de *Tenebrio molitor* e a ração. Os espécimes de Tilápia foram adquiridas no Restaurante Lagoa do Juara (Serra, BRA), Peixaria Recanto da Tilápia (Serra, BRA), Zé Tilápia (Vila Velha, BRA), Peixaria do Pether (Vitória, BRA) e Peixaria Capixaba (Vitória, BRA).

4.2. COLETA E PREPARO DE AMOSTRA

As amostras de tilápias (*Oreochromis spp.*) foram coletadas através de amostragem aleatória simples em mercados locais dos municípios de Vitória, Vila Velha e Serra no estado do Espírito Santo, Brasil. Foram realizadas 6 compras, 2 em cada município. Em cada peixaria foram adquiridos 3 espécimes com peso mínimo de 800g. Todos os animais estavam previamente abatidos, porém não processados, sem sinais de deterioração e com todos os órgãos preservados e sem a presença de abertura abdominal. As aquisições foram realizadas no mesmo dia. Os 18 peixes foram mantidos à temperatura entre 1 e 5 °C, em caixa isotérmica, com gelo desde o momento da compra até o encaminhamento ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da UFES (LBBM), onde foi acondicionado em geladeira à 4 °C, até o processamento no mesmo dia, no período vespertino. A temperatura do laboratório foi mantida, com o uso de ar-condicionado, para 22 °C. Antes do processamento, os peixes foram lavados e o peso de cada indivíduo íntegro foi anotado, para cálculo de rendimento dos resíduos. Com o auxílio de uma faca, foi realizada uma abertura

longitudinal na barriga para a retirada das vísceras (fígado, intestino, rins, gônada, bexiga natatória, coração e brânquias). Cada peixe esviscerado e suas vísceras foram pesados em separado.

4.3. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA

A extração das proteínas foi realizada no LBBMP e no Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares (LABIOM) da UFES que disponibilizou a centrífuga 5804R (Eppendorf, Hamburgo, ALE) e o espectrofotômetro NanoDrop® 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). Para a extração foi utilizado o método de extração com solvente orgânico (acetona) adaptado para lipase de vísceras de tilápias (Kishimura; Hayashi, 2002; Patchimpet; Sangkharak; Klomklao, 2019). O peso de $77,00 \pm 6,00$ g de vísceras de tilápia foi submetida a cinco processos sequenciais para a extração de proteína:

I) As vísceras das 18 amostras do item 4.2 foram trituradas e homogeneizadas utilizando um liquidificador com adição de água a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ o até o ponto de pasta. Uma fração do homogenato de vísceras foi selecionada e pesada para extração.

II) O peso selecionado foi adicionado a razão de $1:3\text{ (m}\cdot\text{v}^{-1}\text{)}$ de acetona PA e a mistura foi deixada sob agitação em um agitador magnético Cimarec SP131635Q (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) a 800 rpm, por 30 min a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$;

III) após 30 min, a mistura foi filtrada utilizando compressas de gaze $13\text{ fios}\cdot\text{cm}^{-2}$, como material filtrante, em um funil de vidro. O sólido retido na filtração foi pesado e a ela foi adicionada a razão de $1:2\text{ (m}\cdot\text{v}^{-1}\text{)}$ de acetona PA e deixados sob agitação novamente em um agitador magnético a 800 rpm, por 30 min a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$;

IV) a mistura foi filtrada e o sólido foi deixado secar, em uma capela de exaustão, em temperatura ambiente por 10 minutos. Após isto, o sólido foi pesado e ressuspenso em uma razão de $1:9\text{ (m}\cdot\text{v}^{-1}\text{)}$ em água destilada contendo $1000\text{ mmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ de NaCl e deixado sob agitação em um agitador magnético a 800 rpm, por 30 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$;

V) a mistura obtida foi submetida a centrifugação por 30 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 5000 g e o sobrenadante resultante foi coletado, analisado em relação a concentração de

proteínas estimada a 280 nm ($1,0 \text{ Abs} = 1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), conforme descrito por Stocheck, (1990), e denominado “extrato proteico”. O extrato proteico obtido foi utilizado para as análises de caracterização enzimática.

4.4. DESSANILIZAÇÃO DO EXTRATO PROTÉICO BRUTO POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR

Com o objetivo de retirar o sal adicionado na fase de extração das proteínas, foi realizada uma cromatografia líquida de exclusão molecular de bancada com uma fase estacionária de 69 cm^{-3} de resina Sephadex® G-25, limite de exclusão de 5.000 Da (Pharmacia Biotech, Estocolmo, Suécia), montada em uma coluna com 2,5 cm de diâmetro interno e 17 cm de altura. Em cada corrida foram adicionados aproximadamente 1,5 g de extrato bruto. A eluição foi do tipo isocrática e a fase móvel foi composta por água destilada acidificada com HCl a pH 3,0 a 4 °C. As amostras foram eluídas em um fluxo de $0,20 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ controlado por uma bomba peristáltica Masterflex® 77122-02 (Thermo Fisher Scientific, Barrington, Estados Unidos da América) e em temperatura constante de 4 °C. As coletas foram realizadas a cada 8 min (1,6 mL) usando um coletor automático Frac-200 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia). Em cada tubo de coleta utilizado foi adicionado, previamente, 50 μL de ácido acético 60 % (p·v⁻¹). Entre o final e o início de uma nova corrida, foram passados o equivalente a dois volumes de coluna de fase móvel para a retirada de resíduos de sais. Para o acompanhamento e separação das amostras contendo proteínas e/ou sal foram utilizados o espectrofotômetro NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific, Waltham, Estados Unidos da América) localizado no LABIOM e do condutivímetro Ak52 (Akso, São Leopoldo, Brasil) cedido pelo departamento de Ciências Fisiológicas da UFES. As amostras contendo absorção em 280 nm foram reunidas, congeladas em $-85 \text{ }^\circ\text{C}$ e liofilizadas no equipamento Liotop® L101 (Liobras, São Carlos, Brasil) a $-55 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.5. CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO MOLECULAR PARA A SEPARAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS

A fim de separar o extrato protéico dessalinizado em frações de diferentes massas, foi realizada uma cromatografia de gel filtração de bancada contendo 269 cm³ de resina Sephadex® G-50 (Pharmacia, Estocolmo, Suécia), faixa de separação entre 1.500 e 30.000 Da, montada em uma coluna com 2,2 cm de diâmetro interno e 75 cm de altura. Em cada corrida foram adicionados aproximadamente 1,0 g de extrato protéico dessalinizado. A eluição foi do tipo isocrática. As amostras foram eluídas em um fluxo de 0,15 mL·min⁻¹ controlado por uma bomba peristáltica Masterflex® 77122-02 (Thermo Fisher Scientific, Barrington, Estados Unidos da América) e em temperatura constante de 4 °C. A fase móvel foi composta por água destilada acidificada pH 3,0 a 4 °C. As coletas foram realizadas a cada 14 minutos (2,1 mL) usando um coletor automático Frac-200 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia). Foi realizado a leitura das amostras coletadas em 280 nm através do espectrofotômetro NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific, Waltham-EUA) localizado no LABIOM. As curvas cromatográficas foram tratadas matematicamente pelo método de deconvolução múltiplos picos, considerando-se os picos de forma gaussiana, utilizando o software OriginPro® 9 (OriginLab Corporation, Northampton, EUA). As amostras foram reunidas em 7 grupos, congeladas em -55 °C e liofilizadas no equipamento Liotop® L101 (Liobras, São Carlos, Brasil).

4.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL DAS FRAÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Um dos métodos mais utilizados para se obter a atividade antioxidante é através da captura do radical ABTS^{•+}, que pode ser gerado por uma reação química, eletrolítica ou enzimática. Com esta metodologia pode-se medir a atividade de compostos de natureza hidrofílico e hidrofóbicos. A metodologia utilizada foi adaptada de Rufino et al., (2007). Foram preparadas soluções estoques de ABTS 7 mmol·L⁻¹, K₂P₂O₈ 140 mmol·L⁻¹, além de uma solução de trolox 2 mmol·L⁻¹ em etanol PA. A solução de radical ABTS^{•+} foi preparado através da adição de 5 mL da solução estoque de ABTS com 88 µL da solução estoque de K₂P₂O₈. A solução resultante foi armazenada em temperatura ambiente e na ausência de luz por 16 horas. Estas atividades descritas foram realizadas no LBBM com a utilização da balança Shimadzu AP225WD Shimadzu (Shimadzu, Kioto, Japão), localizada no LABIOM. Após este o período de

16 horas, diluiu-se 1 mL desta mistura em etanol até obter uma absorbância de $0,70 \pm 0,05$ a 734 nm. Para o preparo da solução de trolox foi utilizado um espectrofotômetro Shimadzu® UV-1280 (Shimadzu, Kioto, Japão) localizado No Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio da UFES (LBAA).

Para a obtenção da curva-padrão do trolox, diluiu-se a solução padrão de trolox $2.000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) com etanol a fim de obter as concentrações finais de $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $1.000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $1.500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e $2.000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Em seguida, 30 μL de cada amostra descrita acima foram adicionadas em 3,0 mL da solução de radical ABTS^{•+}, homogeneizando por 30 segundo em um agitador de tubos e aguardando 6 minutos para a leitura da amostra em 734 nm em um espectrofotômetro Shimadzu® UV-1280 (Shimadzu, Kioto, Japão) localizado No Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio da UFES (LBAA). Todos as etapas do experimento foram realizadas no escuro e em triplicatas e os dados foram expressos como média ($n = 3$) \pm desvio padrão.

Para a realização do ensaio com as amostras, os 7 grupos de frações proteicas selecionadas, foram pesados 20 mg de cada fração e adicionados em tubos. Adicionou, em seguida, 3,0 mL de solução de radical ABTS^{•+}, homogeneizando por 30 segundo em um agitador de tubos e aguardando 6 minutos para a leitura da amostra em 734 nm em um espectrofotômetro Shimadzu® UV-1280 localizado no LBAA.

Os valores de absorbância obtidos foram utilizados na equação de reta da curva padrão de Trolox para obter o resultado em equivalentes a concentração de Trolox. Todos as etapas do experimento foram realizadas no escuro e em triplicatas e os dados foram expressos como média ($n = 3$) \pm desvio padrão.

4.7. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DAS FRAÇÕES EM *Tenebrio molitor*

A fim de realizar uma análise toxicológica com modelo alternativo nas sete frações proteicas, optou-se por utilizar, como cobaias, *T. molitor*. A metodologia adotada foi a de Braga et al., (2024), com modificações. Para isto, 500 Tenébrios, com idade entre

4 e 5 semanas, foram acondicionados em uma caixa plástica com 25 cm de largura, 36 cm de comprimento e 32 cm de altura, mantidos em temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. A tampa da caixa foi modificada com a inclusão de 25 furos de 1 cm de diâmetro. Os insetos foram alimentados *ad libitum* com uma mistura composta por farelo de trigo (50 %) e ração para crescimento de pintinhos (50 %). Como fonte de umidade foram utilizadas rodela de abobrinha italiana (*Cucurbita pepo*). As larvas de *T. molitor* não apresentavam lesões corporais ou melanizações visíveis até o início do experimento. No dia do experimento, as larvas foram aleatoriamente divididas em populações de 10 indivíduos e mantidos durante todo o experimento em potes de plástico de 300 mL com tampa modificada com 4 furos de 5 mm de diâmetro. De cada população foi obtido o peso médio de cada larva. Com o auxílio de uma seringa tipo Hamilton com capacidade para 50 µL, as substâncias testes foram inoculadas na terceira pata falsa das larvas. No grupo controle, as larvas receberam injeção de 5 µL de água destilada; já nos grupos experimentais, as larvas receberam 5 µL de uma solução aquosa contendo 10, 40 ou 80 µg dos extratos proteicos F1, F2, F3, F4, F5, F6 ou F7. Cada grupo de pesquisa foi composto por três populações de tenébrios com 10 espécimes cada, com cada população tendo um extrato protéico preparado e aplicado em separado, portanto, cada grupo foi formado por 30 tenébrios divididos em três populações distintas. Após este procedimento, as larvas de *T. molitor* foram monitoradas durante cinco dias para avaliação da sobrevivência de cada grupo. Animais mortos foram caracterizados como os que apresentavam marcas extensas de melanização, encolhimento, falta de irritabilidade e nenhum movimento após estímulo, sendo removido do experimento tão logo se tenha notado. Os resultados dos dados foram expressos como média ($n = 30$) \pm desvio padrão.

4.7.1. Análise estatística dos dados

As análises estatísticas foram conduzidas com o objetivo de avaliar a toxicidade de 7 frações diferentes em *Tenebrio molitor*, considerando como variável resposta a mortalidade dos indivíduos ao longo de 5 períodos (24, 48, 72, 96 e 120 h) e três doses (10, 40 e 80 µg). Para cada condição (fração \times dose \times tempo), foram utilizados dez insetos, divididos em 3 repetições de 10 indivíduos. Para a confirmação de que os

resultados obtidos sejam significativos, foi realizada uma regressão logística generalizada, utilizando um modelo linear generalizado (GLM binomial) adequada para variáveis de resposta binária (morto/vivo). O modelo incluiu como preditores os fatores '*fração*', '*dose*' e '*tempo*', além de suas interações de primeira e segunda ordem. A variável resposta foi construída a partir do número de mortos e sobreviventes por repetição. Os modelos foram ajustados utilizando a função '*glm*' da biblioteca '*statsmodels*' em Python, com família binomial e função de ligação logit (Seabold; Perktold, 2010). Foram realizados ensaios com a com e sem a presença do grupo controle.

As comparações múltiplas entre frações foram realizadas por meio do teste de Tukey (HSD) com nível de significância de 5,0 % ($\alpha = 0,05$), considerando a mortalidade percentual no tempo final (120 h). O teste foi conduzido utilizando a função '*pairwise_tukeyhsd*' da biblioteca '*statsmodels*' (Seabold; Perktold, 2010). Os resultados foram organizados em forma de tabela e visualizados por meio de *heatmap* binário de significância estatística.

4.8. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A avaliação da atividade antimicrobiana das frações foi realizada por meio da técnica de difusão em disco, conforme o trabalho de Ribeiro, (2024). Para o ensaio, utilizaram-se cepas padrão da American Type Culture Collection (ATCC): *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), provenientes do Laboratório de Ecologia Microbiana do Instituto Federal do Espírito Santo, campus Piúma (IFES Piúma). As bactérias criopreservadas foram reativadas e inoculadas em placas com ágar nutriente, a fim de obter culturas frescas após aproximadamente 18 horas de incubação a 37 °C. Posteriormente, foram preparadas suspensões bacterianas em solução salina estéril (0,85 % p.v⁻¹), ajustadas para uma densidade de 10⁸ ufc·mL⁻¹ com base na escala MacFarland 0,5, utilizando leitura espectrofotométrica a 630 nm.

Utilizando um *swab* estéril, as suspensões foram distribuídas uniformemente na superfície de placas contendo Ágar Müller Hinton. Em seguida, discos de papel filtro com 6 mm de diâmetro receberam 10 µL de cada amostra, contendo 30 µg, e foram

submetidos a secagem em capela de fluxo laminar. Em cada placa, três discos de cada amostra foram aplicados, juntamente com discos impregnados com diferentes antibióticos comerciais, utilizados como referência. Após a incubação das placas a 37 °C por 24 horas, mediu-se o diâmetro dos halos de inibição para determinar o efeito antimicrobiano.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

Para o cálculo de rendimento das vísceras, as amostras de tilápias (n = 18) foram pesadas inteiras e novamente após a evisceração e retirada das brânquias. Os resultados de peso das tilápias inteira, o peso das vísceras e o peso das proteínas extraídas são apresentados na Tabela 1. Os extratos proteicos analisados possuem $38 \pm 1,0$ mg de proteína por grama de víscera de tilápia.

Tabela 1 — Rendimento das extrações das vísceras de tilápia (*Oreochromis spp.*). As porcentagens de peso total das tilápias, peso total das vísceras, peso total de proteínas das vísceras considerando uma projeção da média por g de víscera, são apresentadas em grama (g) e em porcentagem de peso total (%).

Amostra	peso (g)	peso total (%)
Tilápia inteira	$875,00 \pm 11,00$	$100,00, \pm 15,00$
Vísceras	$77,00 \pm 6,00$	$8,80 \pm 1,00$
Proteínas das vísceras	$3,10 \pm 0,30$	$0,35 \pm 0,01$

Fonte: Dados da pesquisa.

De acordo com a Tabela 1, o peso médio das tilápias utilizadas foi de 875 g. As vísceras correspondem a 8,80 % do peso total da tilápia em base úmida, valores próximos aos encontrados por Souza e Maranhão, (2001) (entre 8,69 e 10,90 %) e Freitas e Gurgel, (1984) (11,2 %). Em relação às proteínas das vísceras, em média a cada 77,00 g de vísceras, 3,10 g eram de proteínas, ou 4,06 g de proteínas a cada 100 g de vísceras de tilápia em base úmida (4,06 %). Valores semelhantes aos encontrados para a tilápia por Suprayitno et al., 2019) (3,10 %). Em relação a outras pesquisas utilizando espécies de peixes distintas, os valores de proteínas presentes em vísceras são bastantes variados. A Catla (*Catla catla*), um peixe de água doce encontrada no sul da Ásia, possui 8,52 % de proteínas (Bhaskar et al., 2008). Já as espécies de Salmão-rosa (*Oncorhynchus gorbusha*) (15,30 %), Truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (15,00 %), Sardinha europeia (*Sardina pilchardus*) (15,76 %) e Bacalhau (*Gadus Morhua*) (14,90 %) possuem teores próximos entre si

(BechteleCHTEL, 2003; Kechaou et al., 2009; Šližyte et al., 2005; Taheri et al., 2013). Já o Atum Cavala (*Euthynnus affinis*) possui teor de proteínas nas vísceras em base úmida de 65,04 % (Salwanee et al., 2013). Esses resultados demonstram a grande variação entre as espécies, visto que são seres de diferentes tamanhos, formatos, gêneros, habitat e tipo de alimentação.

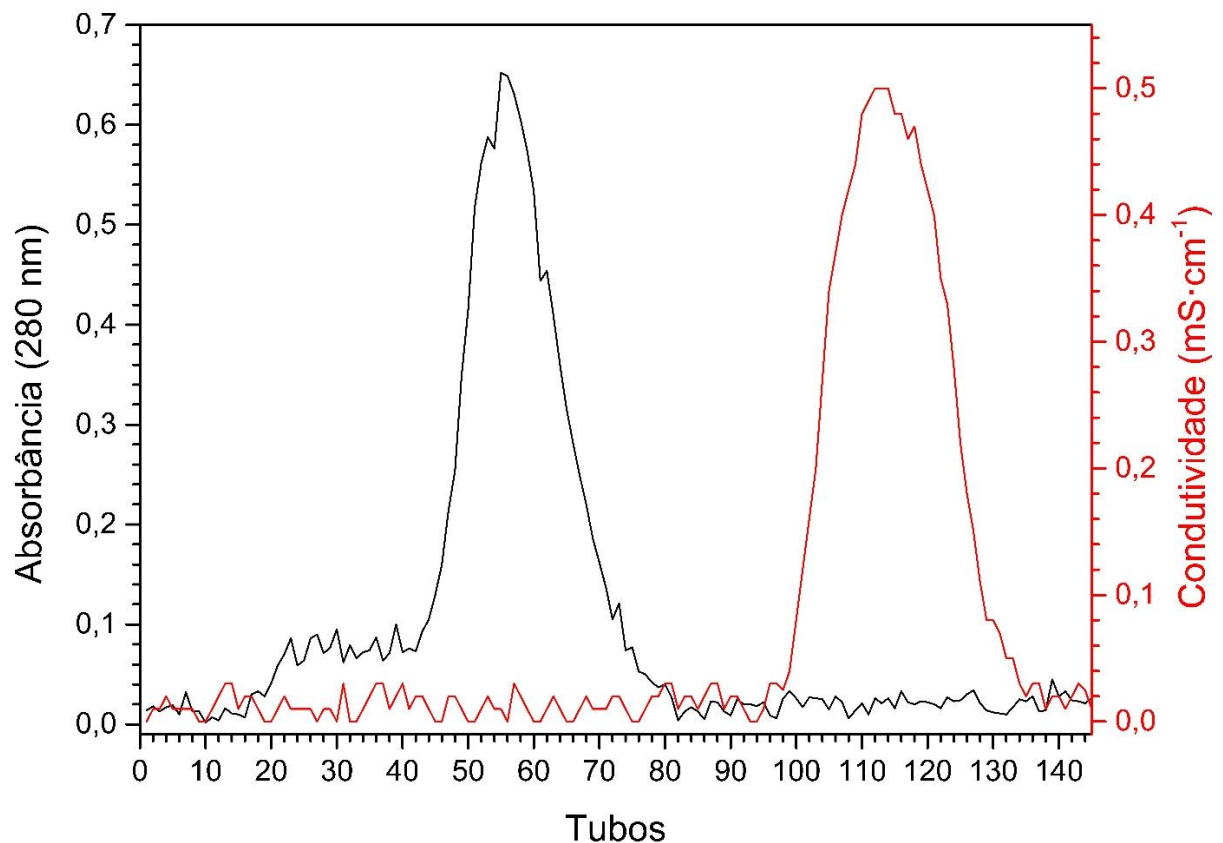
Esse processo de extração utilizando solventes orgânicos tem como objetivo principal a concentração de proteínas. Adicionalmente, nosso objetivo foi preparar uma mistura homogênea de vísceras trituradas com a menor quantidade possível de gordura e outros componentes indesejáveis possível (He; Franco; Zhang, 2013), já que estes constituintes contribuem para a oxidação do extrato (Kristinsson; Rasco, 2000), além de odores desagradáveis e compostos altamente tóxicos (Dong et al., 2008). Além disto, a utilização de solventes orgânicos, como a acetona, minimiza a degradação por bactérias (Kristinsson; Rasco, 2000). Entretanto a utilização de solventes orgânicos, durante a etapa de extração, promove a diminuição da solubilidade e dispersibilidade das proteínas (Klompong et al., 2007). Apesar disso o método se mostrou confiável e com rendimento considerado suficiente para um escalonamento.

Após confirmada a presença de proteína no extrato proteico, 3,10 g a cada 77,00 g de vísceras, através de estimativa espectroscópica da medida de absorção em 280 nm seguiu-se para a purificação das proteínas e peptídeos.

5.2. DESSALINIZAÇÃO DO EXTRATO PROTEÍCO BRUTO

O extrato proteico bruto obtido na seção 4.3 foi submetido a uma cromatografia de exclusão molecular em escala de bancada, uma coluna preenchida com Sephadex® G-25, com o objetivo de remover os sais provenientes do processo de extração anterior. Como pode ser visto no Gráfico 1, as amostras coletadas apresentaram valores residuais de absorbância a 280 nm entre os tubos de coleta 1 (1,6 mL) e 39 (62,4 mL). A partir do tubo 45 (64,0 mL), inicia-se um aumento na absorção até atingir a absorção máxima no tubo 55 (88,0 mL), seguido por uma redução até o tubo 75 (120,0 mL), onde as amostras coletadas voltam a apresentar valores residuais para a absorção em 280 nm.

Gráfico 1 — Cromatografia de exclusão molecular do extrato proteico bruto de vísceras de tilápia. A eluição foi realizada a um fluxo constante de $0,20 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, utilizando como fase estacionária a resina Sephadex® G-25 e como fase móvel água destilada acidificada (pH 3,0), sob temperatura controlada de $4 \text{ }^\circ\text{C}$. As frações foram coletadas a cada 8 minutos (1,6 mL). A absorbância a 280 nm (indicada em preto) foi utilizada para monitorar a presença de proteínas, enquanto a condutividade (indicada em vermelho) permitiu o acompanhamento da presença de sais residuais.



Fonte: dados da pesquisa.

Em relação a condutividade aferida, os valores permaneceram abaixo de $0,04 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ até o tubo 99 (158,4 mL), ponto a partir do qual observou-se um aumento progressivo, atingindo o valor máximo em $0,51 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ no tubo 113 (180,8 mL). Após esse pico, a condutividade diminuiu gradualmente até o tubo 133 (212,8 mL), quando os valores retornaram abaixo de $0,04 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$.

A utilização da resina Sephadex G-25 para a dessalinização de amostras é bastante difundida, devido a sua facilidade de uso e ainda sua eficiência. Cummings e Kornfeld (1982) retiraram sais após o processo de digestão da tiroglobulina, Helmerhorst e Stokes (1980) criaram um método de dessalinização de pequenos volumes de proteínas (50-200 μL) utilizando uma coluna acoplada a um tubo de ensaio rotacionando em uma microcentrífuga. Os sais descritos aqui não se limitam aos sais inorgânicos, como o NaCl adicionado durante a fase de extração, mas incluem os sais orgânicos, por exemplo amino ácidos carregados e ácidos orgânicos presentes naturalmente na composição dos órgãos utilizados (Huang; Guiochon, 1989; Ståhlberg; Jönsson; Horváth, 1991).

Essa etapa de dessalinização é de alta importância para a cadeia do processo, pois ao realizar uma cromatografia sem a dessalinização da amostra, ocorrerá o aumento das interferências provocadas pela interação iônica dos íons dos sais, por processo denominado *Salting out*, que resultará em mudanças nas propriedades da proteína, por exemplo, possibilidade de precipitar durante o processo cromatográfico, e a superfície da coluna, por exemplo, alterando o perfil da corrida cromatográfica (Tsumoto *et al.*, 2007). Portanto, a realização de uma dessalinização eficiente da amostra é necessária para que se obtenha resultados mais precisos nos processos seguintes. Após a cromatografia foram separadas as frações que apresentaram a absorção, em 280 nm, maior do que 0,060, agrupando-os em um único recipiente, que foram em seguida liofilizados e armazenados a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ até a realização da próxima etapa de cromatografia.

A detecção a 280 nm baseia-se na absorção específica de resíduos aromáticos, especialmente triptofano, tirosina e, em menor grau, fenilalanina. Assim, o aumento observado da absorbância entre os tubos 45 (64,0 mL) e 75 (120,0 mL) sugere a eluição de amostras ricas em proteínas ou peptídeos com tais resíduos. Esse perfil é coerente com a seletividade por exclusão de tamanho da matriz Sephadex G-25, que

permite a rápida eluição de macromoléculas com massa molecular superior a aproximadamente 5 kDa, enquanto pequenas moléculas, como íons, permanecem retidas nos poros da matriz por mais tempo, sendo eluídas posteriormente (Bonner, 2018).

Além disso, o fato de a absorção no ultravioleta das moléculas serem dissociadas da condutividade elétrica, indica que a separação dos componentes ocorreu com sucesso, evitando coeluição, o que é desejável em protocolos de preparo amostral.

Do ponto de vista metodológico, a cromatografia em Sephadex G-25 para dessalinização se mostrou vantajosa por sua simplicidade operacional, reprodutibilidade e baixa exigência de equipamentos sofisticados. No entanto, seu poder de resolução é limitado, não sendo adequada para separar proteínas com massas moleculares semelhantes. Para análises posteriores que requeiram maior resolução, como isolamento de isoformas ou complexos proteicos, técnicas complementares são necessárias (Bonner, 2018).

A adoção desta etapa de dessalinização é particularmente relevante em amostras de origem animal, como vísceras de tilápia, que apresentam alta carga de sais endógenos e componentes orgânicos com potencial de interferência em métodos espectrofotométricos, eletroforéticos ou enzimáticos. Portanto, a estratégia aqui empregada configura-se como etapa fundamental para a obtenção de um extrato proteico adequadamente preparado para procedimentos analíticos subsequentes.

5.3. CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR PARA SEPARAÇÃO DAS BIOMOLÉCULAS.

O extrato proteico dessalinizado foi submetido novamente à cromatografia de exclusão molecular utilizando uma coluna preenchida com Sephadex® G-50. Essa resina possui faixa de fracionamento nominal entre 1.500 e 30.000 Da e é amplamente empregada para o fracionamento inicial de misturas complexas de peptídeos e proteínas. A fase móvel foi composta por água destilada acidificada (pH 3,0) e o fluxo de eluição foi mantido em $0,15 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, com coleta das amostras a cada 14 minutos (2,1 mL por tubo), conforme ilustrado no Gráfico 2.

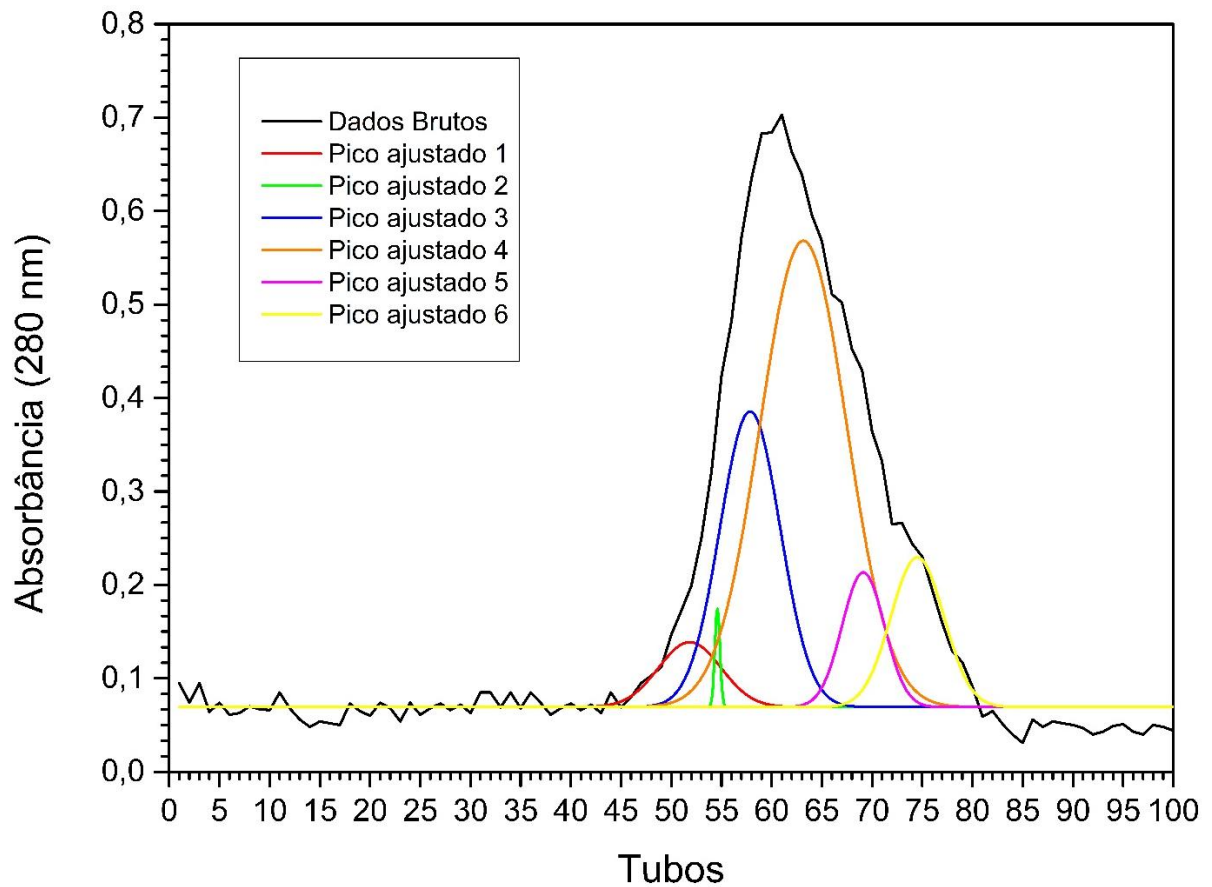
Como pode ser visto no Gráfico 2, o perfil cromatográfico observado revelou uma ampla zona de eluição proteica. Até o tubo 46 (6,90 mL), a absorbância a 280 nm manteve-se abaixo de 0,1. A partir do tubo 47 (7,05 mL), observou-se um aumento na absorbância, atingindo o pico máximo no tubo 61 (128,1 mL), seguido de uma diminuição até o tubo 80 (168,0 mL). Após o tubo 81, os valores de absorbância retornaram a níveis residuais, indicando o término da eluição de biomoléculas detectáveis a 280 nm.

Apesar da baixa resolução resultante (sobreposição entre os picos), revelando a alta complexidade da mistura a aplicação do método de deconvolução multicomponente utilizando o software OriginPro® 9 permitiu a separação matemática de seis picos principais, classificados como "Pico ajustado 1" a "Pico ajustado 6". Estes foram agrupados em sete frações experimentais (Gráfico 3):

- F1: tubo 47 ao 51 (98,7mL–107,1 mL)
- F2: tubo 52 ao 56 (109,2 mL–117,6 mL)
- F3: tubo 57 ao 61 (121,3 mL–128,1 mL)
- F4: tubo 62 ao 66 (130,2 mL–138,6 mL)
- F5: tubo 67 ao 71 (140,7 mL–149,1 mL)
- F6: tubo 72 ao 76 (151,2 mL–159,6 mL)
- F7: tubo 77 ao 81 (161,7 mL–170,1 mL)

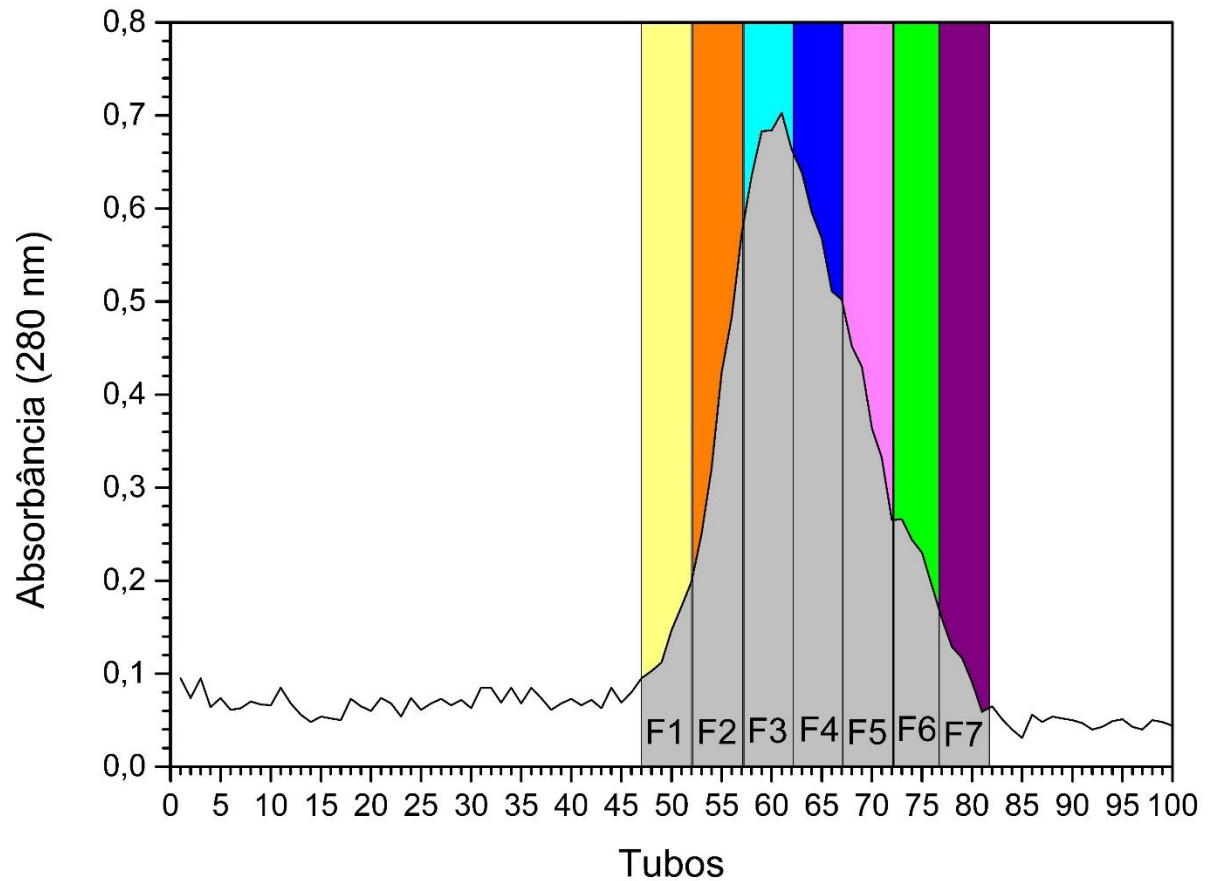
A análise do Gráfico 2 demonstra que a eluição seguiu o princípio da exclusão por tamanho: moléculas maiores, com menor acesso aos poros da matriz, eluem primeiro; enquanto as moléculas menores são eluídas posteriormente. O "Pico ajustado 1" corresponde às macromoléculas de maior dimensão hidrodinâmica, eluindo entre os tubos 45 e 57, enquanto os picos 2 a 6 correspondem a frações de massas moleculares progressivamente menores. O "Pico ajustado 6", eluído entre os tubos 68 e 80, representa peptídeos de menor massa molecular (possivelmente < 2 kDa).

Gráfico 2 — Cromatografia de exclusão molecular do extrato proteico dessalinizado de vísceras de tilápia. Fluxo de $0,15 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A fase estacionária foi composta por Sephadex G-50, usando uma fase móvel composta por água destilada acidificada a pH 3,0 a 4°C . As coletas foram realizadas a cada 14 min (2,1 mL) e as proteínas/peptídeos foram detectados a 280 nm.



Fonte: dados da pesquisa.

Gráfico 3 — Representação gráfica das regiões de separação de cada fração do Gráfico 2. Os marcadores F1 (tubo 47 ao 51), F2 (tubo 52 ao 56), F3 (tubo 57 ao 61), F4 (tubo 62 ao 66), F5 (tubo 67 ao 71), F6 (tubo 72 ao 76) e F7 (tubo 77 ao 81), representam as regiões de coletas para cada fração.



Fonte: dados da pesquisa.

A área sob cada pico ajustado indica a abundância relativa das frações: o "Pico ajustado 4" foi o mais representativo, seguido do "Pico Ajustado 3". A estabilidade da linha de base antes do tubo 40 (6,0 mL) e após o tubo 85 (12,75 mL) indica bom desempenho do sistema cromatográfico, sem arraste ou ruído excessivo.

Apesar da separação preliminar, a sobreposição significativa observada entre os picos ajustados 3, 4 e 5 demonstra limitação da resolução, comum em amostras complexas. Tal limitação pode ser atribuída à carga de amostra, à porosidade da resina e às dimensões da coluna. A utilização de etapas cromatográficas ortogonais ou resinas de faixa mais estreita pode ser considerada para refinar a separação.

A composição proteica de vísceras de peixe é altamente diversificada, incluindo colágeno, enzimas digestivas, proteínas sarcoplasmáticas (e.g., mioglobina ~17 kDa), e diversos peptídeos gerados por hidrólise endógena ou durante o processamento (Riyadi *et al.*, 2021, 2020). Fragmentos de colágeno e proteínas digestivas podem estar presentes nos picos de alto e médio peso molecular, enquanto os picos tardios são provavelmente compostos por peptídeos com massas inferiores a 10 kDa, faixa comumente associada a atividades biológicas (Bougatef *et al.*, 2010; Hsu; Lu; Jao, 2009; Ngo *et al.*, 2010; You *et al.*, 2010).

A aplicação dessa abordagem no fracionamento de extratos proteicos de resíduos pesqueiros é estratégica para a valorização desses subprodutos, alinhando-se ao conceito de economia circular e à busca por ingredientes funcionais. Peptídeos de baixo peso molecular obtidos de pescado têm sido associados a propriedades antioxidantes, anti-hipertensivas e antimicrobianas, além de apresentarem boa biodisponibilidade e estabilidade térmica (Hsu; Lu; Jao, 2009; Je *et al.*, 2007; Ren *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2008).

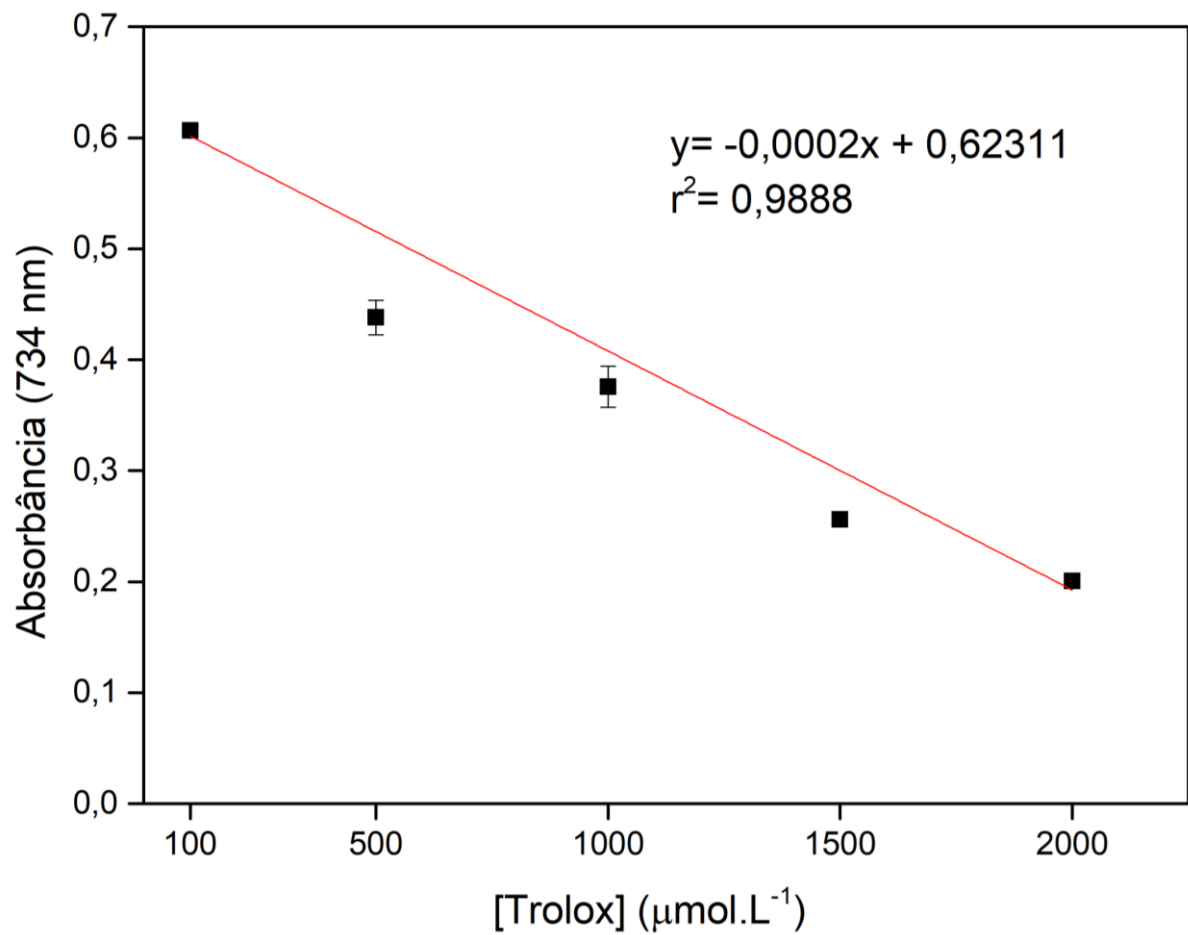
Em síntese, a cromatografia de gel filtração com Sephadex® G-50 permitiu um fracionamento inicial eficaz do extrato proteico de vísceras de tilápia, gerando sete frações com perfis distintos e promissores. A estratégia utilizada representa um passo relevante na bioprospecção de peptídeos bioativos a partir de resíduos da aquicultura, com potencial para aplicações em alimentos funcionais, nutrição, farmacologia e cosméticos.

5.4. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL

Para a quantificação da atividade antioxidante das frações obtidas a partir do hidrolisado de vísceras de tilápia, foi construída uma curva de calibração com Trolox, padrão sintético amplamente utilizado por sua similaridade estrutural com a vitamina E. A curva de calibração (Gráfico 4) foi gerada por regressão linear a partir da absorbância de cinco diferentes concentrações de Trolox, medidas a 734 nm, de acordo com o método descrito por (Rufino *et al.*, 2007). Os resultados foram expressos como média de três réplicas ($n = 3$) \pm desvio padrão.

O Gráfico 4 ilustra a curva de calibração obtida para o Trolox. A concentração de Trolox e a absorbância (734 nm) apresentaram uma correlação linear inversa, expressa pela equação de regressão $y = -0,0002x + 0,62311$. O coeficiente de determinação (r^2) para esta curva foi de 0,9888, mostrando adequação dos dados ao modelo linear proposto. Esta alta linearidade é fundamental para a acurácia na quantificação da atividade antioxidante das amostras desconhecidas. Os valores de r^2 obtidos no presente estudo são consistentes e comparáveis aos reportados na literatura para curvas de calibração de Trolox em ensaios de atividade antioxidante. Por exemplo, Re *et al.* (1999), ao desenvolverem o método ABTS, reportaram um $r^2 = 1$, enquanto Sochor *et al.* (2010) obtiveram um $r^2 = 0,996$ em seus estudos. A robustez da curva padrão estabelecida confere, portanto, confiabilidade aos valores de atividade antioxidante determinados para as frações peptídicas.

Gráfico 4 — Curva de calibração de Trolox: relação entre concentração e absorbância (734 nm), expressa como média \pm desvio padrão (n = 3).



Fonte: dados da pesquisa.

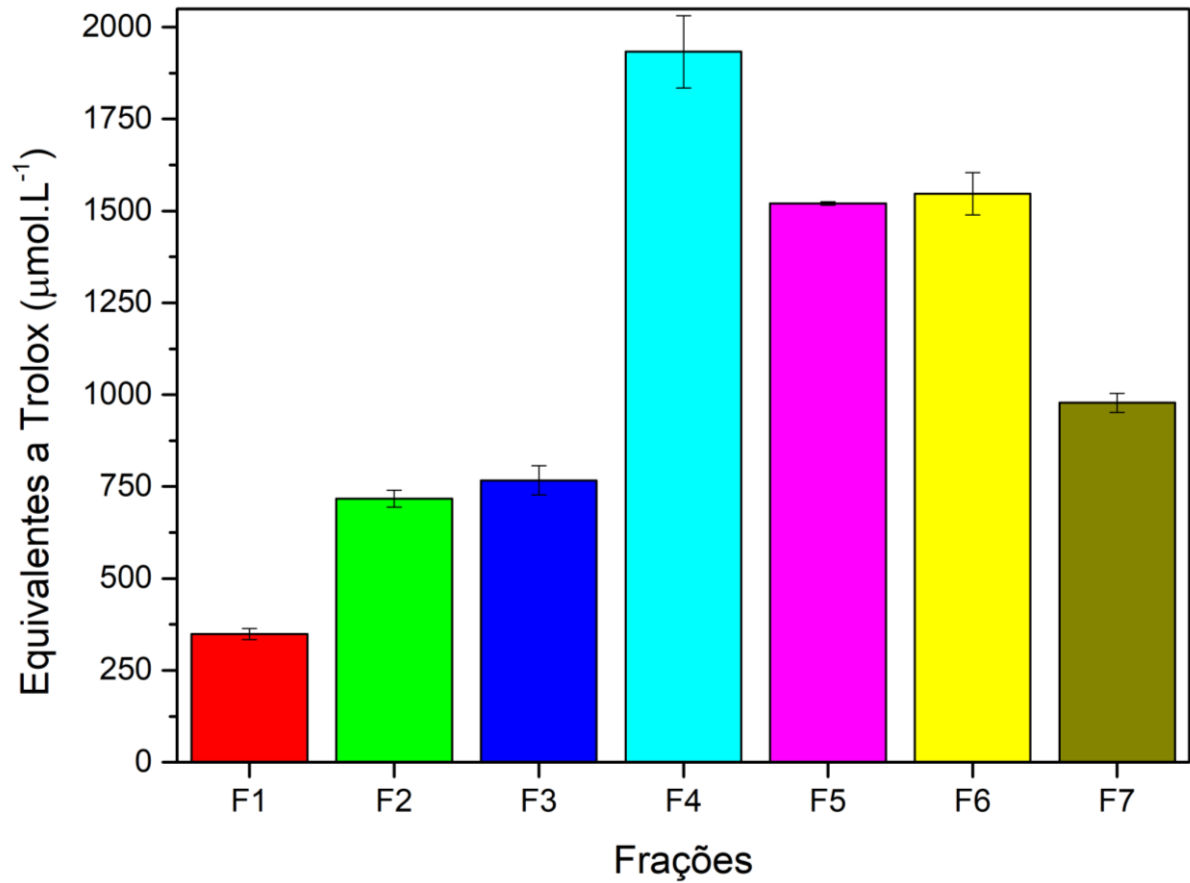
As sete frações (F1 a F7), obtidas previamente pela cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-50 foram submetidas ao ensaio antioxidante utilizando o método ABTS. Os resultados, expressos em $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ equivalentes de Trolox, estão apresentados no Gráfico 5 e representam a média de três determinações ($n = 3$) \pm desvio padrão.

A análise dos resultados (Gráfico 5) revela variações significativas na capacidade antioxidante entre as diferentes frações. A Fração F4 destacou-se por apresentar a maior atividade antioxidante, com um valor de $1933,4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ equivalentes a Trolox. Em seguida, as Frações F6 e F5 também demonstraram atividades antioxidantes consideráveis, com valores de $1546,7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e $1520,5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. As demais frações apresentaram atividades antioxidantes inferiores, na seguinte ordem decrescente: F7 ($978,0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), F3 ($767,2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), F2 ($717,2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e F1 ($348,9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).

A eluição por exclusão molecular separa moléculas com base em seu volume hidrodinâmico. A concentração de peptídeos bioativos nas frações F4, F5 e F6 sugere que essas contenham predominantemente peptídeos de baixo a médio peso molecular, faixa geralmente associada a maior atividade antioxidante. Estudos indicam que peptídeos com massa inferior a 3 kDa apresentam elevada eficiência na neutralização de radicais livres devido à maior exposição de resíduos funcionais e menor impedimento estérico (Ren *et al.*, 2008; Samaranyaka; Kitts; Li-Chan, 2010).

A composição em aminoácidos influencia fortemente a atividade antioxidante dos peptídeos. Resíduos aromáticos (triptofano, tirosina, fenilalanina), sulfurados (cisteína, metionina) e aqueles capazes de quelar metais (histidina, aspártico, glutâmico) participam de mecanismos como: (i) doação de elétrons ou átomos de hidrogênio para neutralização de radicais livres, (ii) quelação de íons metálicos pró-oxidantes e (iii) inibição de enzimas geradoras de espécies reativas de oxigênio (Chen, Hua-Ming *et al.*, 1998; Dávalos *et al.*, 2004; Hernández-Ledesma *et al.*, 2005).

Gráfico 5 — Atividade antioxidante total das frações F1 a F7, expressa em equivalentes de Trolox ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), apresentada como média \pm desvio padrão (n = 3).



Fonte: dados da pesquisa.

O ensaio ABTS utilizado avalia a capacidade da amostra de neutralizar o radical catiônico ABTS•+, que possui absorvância máxima a 734 nm. A redução da absorvância é proporcional à potência antioxidante dos compostos presentes. Esse ensaio é especialmente eficaz para matrizes hidrossolúveis como hidrolisados de pescado (Arnao; Cano; Acosta, 2001). A menor atividade observada em F1 a F3 pode estar relacionada à presença de peptídeos de maior tamanho ou menor densidade de grupos funcionais antioxidantes ou conseqüente presença de proteínas maiores, cujos aminoácidos com atividade antioxidante estariam escondidos no core da proteína. A fração F7, eluída mais tardiamente, apresentou atividade intermediária, sugerindo presença de peptídeos menores ou outros metabólitos antioxidantes. Estudos similares demonstram resultados compatíveis: peptídeos de baixo peso molecular extraídos de peixes como *Dosidicus gigas* e *Lophius litulons* apresentam notável capacidade antioxidante (Chi *et al.*, 2014; Rajapakse *et al.*, 2005). Zhang, Duan e Zhuang, (2012) observaram peptídeos antioxidantes derivados da pele de tilápia com potentes efeitos neutralizantes de radicais após ultrafiltração.

Deve-se considerar que cada fração coletada não representa um único peptídeo isolado, mas sim uma mistura complexa de diferentes peptídeos com massas e estruturas distintas. Essa complexidade pode contribuir para efeitos de sinergismo entre os peptídeos presentes, aumentando a capacidade antioxidante observada em determinadas frações. Esse sinergismo pode ocorrer de diversas formas: (i) complementaridade de mecanismo de ação, onde peptídeos diferentes podem atuar por mecanismos distintos. (II) estabilização mútua, onde alguns peptídeos podem proteger outros da degradação oxidativa. (III) alcance ampliado de alvos oxidantes, onde a mistura de peptídeos com diferentes características físico-químicas, pode permitir a atuação em ambientes polares e apolares, permitindo uma neutralização mais eficaz de diferentes tipos de radicais. De acordo com Sarmadi e Ismail (2010) a combinação de peptídeos com diferentes mecanismos de ação antioxidante pode resultar em um efeito aditivo ou até mesmo sinérgico, o que pode explicar os elevados valores de atividade nas frações F4, F5 e F6, mesmo sem purificação completa.

Esses resultados reforçam o potencial biotecnológico das frações F4, F5 e F6 como fontes de antioxidantes naturais. O uso potencial desses peptídeos em alimentos funcionais, cosméticos e nutracêuticos também deve ser considerado. Dessa forma,

a valorização das vísceras de tilápia como fonte de antioxidantes peptídicos contribui para a sustentabilidade da cadeia produtiva e para o desenvolvimento de alternativas naturais a antioxidantes sintéticos.

5.5. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DAS FRAÇÕES CROMATOGRAFICAS EM *Tenebrio molitor*

As larvas de *T. molitor* foram utilizadas como modelo para investigar os efeitos tóxicos potenciais de frações proteicas extraídas de vísceras de tilápia (*Oreochromis spp.*), visando identificar perfis de toxicidade relacionados a diferentes composições peptídicas, de acordo com os princípios dos 3Rs e a crescente adoção de metodologias de toxicidade ambientalmente sustentáveis (Braga *et al.*, 2024; Brai *et al.*, 2023; Sun *et al.*, 2025).

A análise da mortalidade acumulada revelou que a exposição de *T. molitor* às diferentes frações em três dosagens (10, 40 e 80 µg), monitorada ao longo de 120 horas, resultou em padrões distintos de toxicidade entre os tratamentos. A tabela 2 apresenta a mortalidade registrada, em porcentagem, após cada período de 24 horas.

O grupo controle (água) manteve mortalidade nula ($0,00 \pm 0,00$ %) durante todo o experimento, o que validou a metodologia e confirmou que os efeitos observados nos demais grupos foram atribuíveis exclusivamente às frações aplicadas.

Entre as frações testadas, observou-se que a mortalidade aumentou de forma dependente do tempo e da dose aplicada. Em geral, as menores doses (10 µg) produziram efeitos mais discretos, com médias de mortalidade entre 26,67 e 73,33 %, enquanto nas doses de 80 µg, os valores chegaram a 100,00 % de mortalidade em várias frações. As frações F3, F4 e F6 foram as que apresentaram as maiores taxas de mortalidade acumulada nas doses de 80 µg, atingindo 100,00 % aos 96 (F4) ou 120 horas (F3 e F6). Em contraste, a fração F2 foi associada a mortalidades acumuladas mais baixas, nas doses de 10 e 40 µg, com valores variando entre 26,67 % (10 µg) e 36,67 % (40 µg) mesmo após 120 horas.

Tabela 2 — Mortalidade acumulada (%) de *T. molitor* em diferentes tempos (24 a 120 horas) após aplicação de frações em três concentrações (10, 40 e 80 µg). Os valores representam a média ± desvio padrão de três repetições independentes.

(continua)

Amostra	Concentração (µg)	Tempo (h)	Mortalidade Acumulada (%)
F1	10	24	33,33 ± 5,77
		48	33,33 ± 5,77
		72	40,00 ± 0,00
		96	60,00 ± 0,00
		120	60,00 ± 0,00
F1	40	24	36,67 ± 5,77
		48	43,33 ± 5,77
		72	50,00 ± 0,00
		96	53,33 ± 5,77
		120	60,00 ± 0,00
F1	80	24	40,00 ± 0,00
		48	46,67 ± 5,77
		72	56,67 ± 5,77
		96	63,33 ± 5,77
		120	66,67 ± 5,77

Tabela 2 — Mortalidade acumulada (%) de *T. molitor* em diferentes tempos (24 a 120 horas) após aplicação de frações em três concentrações (10, 40 e 80 µg). Os valores representam a média ± desvio padrão de três repetições independentes.

(Continuação)

Amostra	Concentração (µg)	Tempo (h)	Mortalidade Acumulada (%)
F2	10	24	0,00 ± 0,00
		48	0,00 ± 0,00
		72	6,67 ± 5,77
		96	6,67 ± 5,77
		120	26,67 ± 5,77
F2	40	24	16,67 ± 5,77
		48	16,67 ± 5,77
		72	16,67 ± 5,77
		96	53,33 ± 5,77
		120	56,67 ± 5,77
F2	80	24	40,00 ± 0,00
		48	40,00 ± 0,00
		72	53,33 ± 11,54
		96	60,00 ± 0,00
		120	76,67 ± 5,77

Tabela 2 — Mortalidade acumulada (%) de *T. molitor* em diferentes tempos (24 a 120 horas) após aplicação de frações em três concentrações (10, 40 e 80 µg). Os valores representam a média ± desvio padrão de três repetições independentes.

(Continuação)

Amostra	Concentração (µg)	Tempo (h)	Mortalidade Acumulada (%)
F3	10	24	13,33 ± 5,77
		48	13,33 ± 5,77
		72	13,33 ± 5,77
		96	20,00 ± 0,00
		120	56,67 ± 5,77
F3	40	24	40,00 ± 0,00
		48	53,33 ± 5,77
		72	56,67 ± 5,77
		96	60,00 ± 0,00
		120	86,67 ± 5,77
F3	80	24	40,00 ± 0,00
		48	56,67 ± 5,77
		72	60,00 ± 5,77
		96	63,33 ± 0,00
		120	100,00 ± 0,00

Tabela 2 — Mortalidade acumulada (%) de *T. molitor* em diferentes tempos (24 a 120 horas) após aplicação de frações em três concentrações (10, 40 e 80 µg). Os valores representam a média ± desvio padrão de três repetições independentes.

(Continuação)

Amostra	Concentração (µg)	Tempo (h)	Mortalidade Acumulada (%)
F4	10	24	13,33 ± 5,77
		48	33,33 ± 5,77
		72	33,33 ± 11,54
		96	36,67 ± 5,77
		120	60,00 ± 0,00
F4	40	24	43,33 ± 5,77
		48	46,67 ± 5,77
		72	53,33 ± 5,77
		96	80,00 ± 0,00
		120	86,67 ± 5,77
F4	80	24	56,67 ± 5,77
		48	60,00 ± 0,00
		72	83,33 ± 5,77
		96	100,00 ± 0,00
		120	100,00 ± 0,00

Tabela 2 — Mortalidade acumulada (%) de *T. molitor* em diferentes tempos (24 a 120 horas) após aplicação de frações em três concentrações (10, 40 e 80 µg). Os valores representam a média ± desvio padrão de três repetições independentes.

(Continuação)

Amostra	Concentração (µg)	Tempo (h)	Mortalidade Acumulada (%)
F5	10	24	20,00 ± 0,00
		48	26,67 ± 5,77
		72	40,00 ± 0,00
		96	53,33 ± 5,77
		120	66,67 ± 5,77
F5	40	24	33,33 ± 5,77
		48	40,00 ± 0,00
		72	46,67 ± 5,77
		96	66,67 ± 5,77
		120	86,67 ± 5,77
F5	80	24	53,33 ± 5,77
		48	53,33 ± 5,77
		72	56,67 ± 5,77
		96	70,00 ± 0,00
		120	93,33 ± 5,77

Tabela 2 — Mortalidade acumulada (%) de *T. molitor* em diferentes tempos (24 a 120 horas) após aplicação de frações em três concentrações (10, 40 e 80 µg). Os valores representam a média ± desvio padrão de três repetições independentes.

(Continuação)

Amostra	Concentração (µg)	Tempo (h)	Mortalidade Acumulada (%)
F6	10	24	33,33 ± 5,77
		48	36,67 ± 5,77
		72	53,33 ± 5,77
		96	56,67 ± 5,77
		120	73,33 ± 5,77
F6	40	24	33,33 ± 5,77
		48	40,00 ± 0,00
		72	60,00 ± 0,00
		96	63,33 ± 5,77
		120	80,00 ± 0,00
F6	80	24	43,33 ± 5,77
		48	46,67 ± 5,77
		72	66,67 ± 5,77
		96	66,67 ± 5,77
		120	100,00 ± 0,00

Tabela 2 — Mortalidade acumulada (%) de *T. molitor* em diferentes tempos (24 a 120 horas) após aplicação de frações em três concentrações (10, 40 e 80 µg). Os valores representam a média ± desvio padrão de três repetições independentes.

(Continuação)

Amostra	Concentração (µg)	Tempo (h)	Mortalidade Acumulada (%)
F7	10	24	13,33 ± 5,77
		48	13,33 ± 5,77
		72	13,33 ± 5,77
		96	40,00 ± 0,00
		120	63,33 ± 5,77
F7	40	24	20,00 ± 0,00
		48	23,33 ± 5,77
		72	33,33 ± 11,54
		96	46,67 ± 11,54
		120	86,67 ± 11,54
F7	80	24	26,67 ± 5,77
		48	40,00 ± 0,00
		72	50,00 ± 0,00
		96	56,67 ± 5,77
		120	93,33 ± 5,77

Tabela 2 — Mortalidade acumulada (%) de *T. molitor* em diferentes tempos (24 a 120 horas) após aplicação de frações em três concentrações (10, 40 e 80 µg). Os valores representam a média ± desvio padrão de três repetições independentes.

(Conclusão)

Amostra	Concentração (µg)	Tempo (h)	Mortalidade Acumulada (%)
Controle	0	24	0,00 ± 0,00
		48	0,00 ± 0,00
		72	0,00 ± 0,00
		96	0,00 ± 0,00
		120	0,00 ± 0,00

Fonte: Dados da pesquisa.

A fim de confirmar se os resultados obtidos foram estatisticamente significativos, foi realizada uma análise utilizando o modelo de regressão logística (GLM binomial) para analisar a influência dos fatores “fração”, “dose” e “tempo” sobre a mortalidade em *T. molitor*. A variável resposta foi o número de mortos por grupo, com o número de sobreviventes complementares, assumindo a distribuição binomial. Neste primeiro momento, as frações foram comparadas com o controle. Optou-se pelo modelo GLM binomial em vez de ANOVA, pois a variável resposta é binária (morto/vivo), o que viola os pressupostos de normalidade e homocedasticidade exigidos pela ANOVA. O GLM binomial é mais apropriado para dados de contagem com distribuição binomial e permite avaliar a influência simultânea de fração, dose e tempo sobre a probabilidade de mortalidade. Assim a Tabela 3 apresenta os resultados para os termos que apresentaram valores significativos:

Tabela 3 — Resultados significativos das estimativas dos coeficientes do modelo de regressão logística binomial (GLM) para a mortalidade de *T. molitor* em função da dose ('dose (μg ')), tempo ('horas') e interações com as frações, utilizando a amostra controle como referência.

Termo ^A	Coeficiente ^B	Desv. Pad.^C	Z ^d	P> z ^e	[0.025 ^f	0.975] ^f
Q('dose (μg '))	0,0159	0,0032	5,0474	0	0,0097	0,0221
fração[T.F2]:Q('dose (μg '))	0,0368	0,0115	3,2104	0,0013	0,0143	0,0592
fração[T.F6]:Q('dose (μg '))	-0,0158	0,0079	-1,9995	0,0456	-0,0313	-0,0003
fração[T.F4]:Q('dose (μg ')):Horas	0,0003	0,0001	2,4731	0,0134	0,0001	0,0006

Fonte: Dados da pesquisa.

^a Nome da variável incluída no modelo.

^b Valor estimado do log-odds associado ao termo. Indica a direção e a intensidade do efeito sobre a probabilidade de mortalidade.

^c Desvio padrão.

^d Estatística Z. Coeficiente dividido pelo desvio padrão.

^e A probabilidade de observar um valor da estatística z tão extremo quanto o obtido se a hipótese nula (coeficiente = 0) for verdadeira.

^f Intervalo de confiança de 95 % para o coeficiente.

Como pode ser visto, a Tabela 3 apresenta 4 termos que apresentaram valores significativos. (I) O termo “Q('dose (μg))”, que representa o efeito da dose, em μg , no controle, apresenta um coeficiente = 0,0159 e um p-valor = 0, indicando que a mortalidade aumenta significativamente com o aumento da dose. (II) o termo “fração[T.F2]:Q('dose (μg))”, que representa a diferença do efeito do aumento da dose sobre a fração F2, obteve um coeficiente = 0,0368 e um p-valor = 0,0013, indicando que a fração F2 apresenta uma maior sensibilidade ao aumento da dose. (III) O termo “fração[T.F6]:Q('dose (μg))”, que representa a diferença do efeito do aumento da dose sobre a fração F6, obteve um valor de coeficiente de -0,158 e um valor de p = 0,0456, indicando que a fração F6 apresenta uma menor sensibilidade ao aumento da dose, indicando que para a fração F6, o aumento da dose tem um efeito menor sobre a mortalidade. (IV) “fração[T.F4]:Q('dose (μg)):Horas”, que representa a diferença na interação dose-tempo entre a fração F6 e o controle, apresenta um coeficiente = 0,00003 e um p-valor = 0,0134, indicando que o fator dose-tempo provoca um leve aumento do efeito fração F6 em comparação ao controle. As análises para os termos que não apresentaram valores significativos estão disponíveis no Apêndice A.

Devido à ausência de mortes no grupo controle, observou-se uma separação perfeita nos modelos logísticos, quando comparado com o grupo controle, provocando um p-valor muito próximo de 1,0, o que dificultou a estimação precisa dos coeficientes das frações. Por este motivo, optou-se a realizar uma nova análise, excluindo desta vez o grupo controle e avaliar comparativamente as frações testados em relação a fração F2. Deste modo, foi ajustado um novo modelo GLM binomial, utilizando F2 como grupo de referência. A variável resposta foi construída a partir da contagem de indivíduos mortos e sobreviventes por repetição, com preditores incluindo os fatores 'fração', 'dose' e 'tempo', bem como suas interações de primeira e segunda ordem. A Tabela 4 apresenta os resultados encontrados.

Tabela 4 — Estimativas dos parâmetros do modelo de regressão logística binomial (GLM) para a mortalidade acumulada de *T. molitor*, considerando os efeitos principais e as interações entre fração, dose (μg) e tempo (horas).

(Continua)

Termo ^A	Coefficiente ^B	Desv. Pad.^C	Z ^d	P> z ^e	[0.025 ^f	0.975] ^f
Intercept	-5,0492	0,8509	-5,9338	0	-6,7169	-3,3814
fração[F2.F1]	3,8706	0,9493	4,0771	0	2,0099	5,7312
fração[F2.F3]	2,6939	0,9824	2,742	0,0061	0,7683	4,6194
fração[F2.F4]	3,1699	0,9683	3,2737	0,0011	1,2721	5,0678
fração[F2.F5]	2,8235	0,9696	2,9119	0,0036	0,923	4,7239
fração[F2.F6]	3,7967	0,953	3,984	0,0001	1,9289	5,6645

Tabela 4 — Estimativas dos parâmetros do modelo de regressão logística binomial (GLM) para a mortalidade acumulada de *T. molitor*, considerando os efeitos principais e as interações entre fração, dose (μg) e tempo (horas).

(Continuação)

Termo ^A	Coefficiente ^B	Desv. Pad. ^C	Z ^d	P> z ^e	[0.025 ^f	0.975] ^f
fração[F2.F7]	1,6576	1,0297	1,6098	0,1074	-0,3606	3,6758
Q('dose (μg '))	0,0527	0,0127	4,1449	0	0,0278	0,0777
fração[F2.F1]:Q('dose (μg '))	-0,0456	0,015	-3,0357	0,0024	-0,075	-0,0162
fração[F2.F3]:Q('dose (μg '))	-0,0341	0,0156	-2,1925	0,0283	-0,0647	-0,0036
fração[F2.F4]:Q('dose (μg '))	-0,0416	0,0157	-2,6512	0,008	-0,0724	-0,0109
fração[F2.F5]:Q('dose (μg '))	-0,0337	0,0154	-2,1956	0,0281	-0,0638	-0,0036

Tabela 4 — Estimativas dos parâmetros do modelo de regressão logística binomial (GLM) para a mortalidade acumulada de *T. molitor*, considerando os efeitos principais e as interações entre fração, dose (μg) e tempo (horas).

(Continuação)

Termo ^A	Coefficiente ^B	Desv. Pad. ^C	Z ^d	P> z ^e	[0.025 ^f	0.975] ^f
fração[F2.F6]:Q('dose (μg '))	-0,0526	0,0152	-3,4545	0,0006	-0,0824	-0,0227
fração[F2.F7]:Q('dose (μg '))	-0,0339	0,0163	-2,0852	0,0371	-0,0658	-0,002
Horas	0,0283	0,009	3,1481	0,0016	0,0107	0,0459
fração[F2.F1]:Horas	-0,0155	0,0104	-1,4937	0,1352	-0,0359	0,0048
fração[F2.F3]:Horas	-0,0118	0,0107	-1,1044	0,2694	-0,0329	0,0092
fração[F2.F4]:Horas	-0,0156	0,0107	-1,4628	0,1435	-0,0366	0,0053
fração[F2.F5]:Horas	-0,0044	0,0107	-0,4102	0,6817	-0,0253	0,0165

Tabela 4 — Estimativas dos parâmetros do modelo de regressão logística binomial (GLM) para a mortalidade acumulada de *T. molitor*, considerando os efeitos principais e as interações entre fração, dose (μg) e tempo (horas).

(Continuação)

Termo ^A	Coefficiente ^B	Desv. Pad. ^C	Z ^d	P> z ^e	[0.025 ^f	0.975] ^f
fração[F2.F6]:Horas	-0,0123	0,0105	-1,1651	0,244	-0,0329	0,0084
fração[F2.F7]:Horas	0,0018	0,0111	0,1576	0,8748	-0,0201	0,0236
Q('dose (μg ')):Horas	-0,0002	0,0001	-1,2265	0,22	-0,0005	0,0001
fração[F2.F1]:Q('dose (μg ')):Horas	0,0002	0,0002	0,8769	0,3805	-0,0002	0,0005
fração[F2.F3]:Q('dose (μg ')):Horas	0,0003	0,0002	1,5392	0,1237	-0,0001	0,0006
fração[F2.F4]:Q('dose (μg ')):Horas	0,0005	0,0002	2,6783	0,0074	0,0001	0,0009

Tabela 4 — Estimativas dos parâmetros do modelo de regressão logística binomial (GLM) para a mortalidade acumulada de *T. molitor*, considerando os efeitos principais e as interações entre fração, dose (μg) e tempo (horas).

Termo ^A	Coeficiente ^B	Desv. Pad. ^C	Z ^d	P> z ^e	(Conclusão)	
					[0.025 ^f	0.975] ^f
fração[F2.F5]:Q('dose (μg ')):Horas	0,0001	0,0002	0,7037	0,4816	-0,0002	0,0005
fração[F2.F6]:Q('dose (μg ')):Horas	0,0003	0,0002	1,7167	0,086	0	0,0007
fração[F2.F7]:Q('dose (μg ')):Horas	0,0002	0,0002	0,8675	0,3857	-0,0002	0,0005

Fonte: Dados da pesquisa.

^a Nome da variável incluída no modelo.

^b Valor estimado do log-odds associado ao termo. Indica a direção e a intensidade do efeito sobre a probabilidade de mortalidade.

^c Desvio padrão.

^d Estatística Z. Coeficiente dividido pelo desvio padrão.

^e A probabilidade de observar um valor da estatística z tão extremo quanto o obtido se a hipótese nula (coeficiente = 0) for verdadeira.

^f Intervalo de confiança de 95 % para o coeficiente.

Como pode ser observado na Tabela 4, os resultados revelaram que todas as frações, com exceção de F7, apresentaram mortalidade significativamente superior à observada em F2. As frações F1, F3, F4, F5 e F6 apresentaram coeficientes positivos com p-valores inferiores a 0,01, indicando que a mortalidade nesses grupos foi estatisticamente maior em comparação com F2, independentemente da dose aplicada. Em particular, F1 e F6 apresentaram os maiores coeficientes (3,87 e 3,80, respectivamente), destacando-se como as frações de maior toxicidade relativa no modelo.

A variável 'dose' foi significativa no modelo, indicando um aumento na mortalidade com o incremento da concentração para todos os grupos. No entanto, os coeficientes de interação entre fração e 'dose' revelaram diferenças no padrão dose-resposta entre as frações. A fração F2 apresentou a curva mais inclinada (coeficiente de dose = 0,0527), sugerindo uma maior sensibilidade ao aumento da concentração. As frações F1, F3, F4, F5, F6 e F7 apresentaram coeficientes negativos para essa interação, indicando que a inclinação de suas curvas foi inferior à de F2, ou seja, a resposta à dose foi mais gradual.

O tempo de exposição ('Horas') também foi significativo, com coeficiente positivo (0,0283), indicando aumento progressivo da mortalidade ao longo do tempo. Uma interação significativa tripla foi observada para a fração F4 (fração × dose × tempo), indicando que, nessa fração, o efeito da dose foi potencializado ao longo da exposição.

Em resumo, a fração F2 demonstrou ser o menos tóxico em termos de mortalidade basal, embora sua curva dose-resposta seja acentuada. A modelagem com F2 como referência foi útil para identificar frações com maior toxicidade relativa, sendo F1 e F6 os mais destacados nesse aspecto. O modelo GLM binomial permitiu uma análise robusta das interações entre fração, dose e tempo, fornecendo informações detalhadas sobre os padrões de toxicidade entre os tratamentos.

A mortalidade média percentual de *T. molitor* variou significativamente entre as frações ao longo do tempo. Para investigar essas diferenças, foi aplicado o teste de Tukey HSD a cada tempo experimental, com base nas médias por repetição. As

frações foram agrupados por letras, conforme a similaridade estatística de seus efeitos letais (Quadro 1).

Quadro 1 — Letras de agrupamento estatístico obtidas por teste de comparações múltiplas de Tukey ($p < 0,05$) aplicadas às médias de mortalidade acumulada de *Tenebrio molitor* por fração e tempo (24 a 120 h). Letras iguais indicam que os extratos não diferem estatisticamente entre si no respectivo tempo. letras diferentes indicam diferença significativa.

Fração	Tempo (horas)				
	24	48	72	96	120
F1	A	A	A	A	A
F2	A	A	A	A	A
F3	A	A	AB	B	B
F4	A	A	B	C	C
F5	A	AB	B	C	C
F6	A	B	C	C	C
F7	A	A	AB	B	B

Fonte: Dados da pesquisa.

Conforme pode ser visto no Quadro 1, as setes frações estão sendo classificadas em 3 grupos: A, baixa toxicidade; B, toxicidade intermediária; e C, alta toxicidade. No tempo inicial (24 horas), todas as frações pertenciam ao mesmo grupo estatístico (letra A), indicando ausência de diferenças significativas entre os tratamentos. A partir de 48 horas, as frações começaram a se separar, com a fração F4 já se agrupando separadamente (letra B), sugerindo maior toxicidade precoce.

Essa tendência se intensificou ao longo do tempo. Em 72 e 96 horas, as frações F4, F5 e F6 apresentaram letras distintas dos demais, posicionando-se consistentemente em grupos mais tóxicos (letras B ou C), enquanto F1 e F2 permaneceram nos grupos de menor mortalidade.

No tempo final (120 horas), as frações se organizaram em três grupos estatisticamente distintos:

- Baixa toxicidade: F1 e F2 (letra A),
- Toxicidade intermediária: F3 e F7 (letra B),
- Alta toxicidade: F4, F5 e F6 (letra C).

Esse padrão revela que a atividade letal das frações é tempo-dependente e que a separação estatística entre os tratamentos só se torna marcante após 72 horas, consolidando-se nas últimas 48 horas do experimento.

As frações F4, F5 e F6 apresentaram os maiores níveis de toxicidade, com mortalidade total (100 %) em altas doses. A fração F2 destacou-se por sua baixa toxicidade, mesmo em doses elevadas. Análises estatísticas com modelos lineares generalizados (GLM) binomiais confirmaram esses achados e permitiram discriminar com precisão os efeitos relativos de cada fração. O GLM também evidenciou que, embora F2 fosse menos tóxica em termos absolutos, sua curva dose-resposta apresentava uma inclinação mais acentuada, indicando que a toxicidade aumenta de forma mais abrupta com a dose.

A variabilidade entre as frações pode ser atribuída à composição específica de peptídeos, considerando tamanho, carga, hidrofobicidade e sequência. Peptídeos ricos em aminoácidos catiônicos e hidrofóbicos têm maior propensão para interagir com membranas celulares, o que pode levar a efeitos não seletivos sobre organismos não alvo (Ryadnov, 2019).

A utilização de *T. molitor*, embora ainda não amplamente empregada para testar peptídeos de pescado, é coerente com trabalhos recentes que avaliam pesticidas, extratos vegetais e compostos bioativos em insetos (Martínez *et al.*, 2018; Park *et al.*, 2003).

Os dados aqui obtidos reforçam o potencial do modelo *T. molitor* como ferramenta para triagem toxicológica. As frações menos tóxicas (como F2) podem ser consideradas para aplicações funcionais, especialmente se apresentarem outras bioatividades, como antioxidante. Já as frações mais tóxicas (F4, F5, F6) podem ser exploradas como peptídeos com potencial uso em biocontrole ou aplicações

farmacológicas, após caracterização detalhada da especificidade e seletividade de sua ação.

Assim, este estudo contribui significativamente para o conhecimento sobre a segurança de frações proteicas de pescado, validando o uso de *T. molitor* como bioindicador eficiente e auxiliando na triagem de peptídeos com potencial aplicação biotecnológica. Esta observação é coerente com os achados prévios relacionados à atividade antioxidante total das frações F4, F5 e F6, discutidos anteriormente neste trabalho, em que também se destacou a complexidade composicional de frações não purificadas.

Adicionalmente, deve-se considerar que cada fração proteica, obtida por métodos cromatográficos como a filtração em gel, pode conter múltiplos peptídeos com diferentes estruturas, cargas e polaridades. A presença simultânea desses peptídeos pode resultar em efeitos tóxicos que não seriam evidentes se avaliados isoladamente. Essa possibilidade de efeitos aditivos ou sinérgicos deve ser considerada, principalmente em frações que induziram mortalidade elevada. O sinergismo pode ocorrer, por exemplo, quando um peptídeo aumenta a permeabilidade da membrana celular, facilitando a entrada de outro peptídeo mais citotóxico, ou quando atuam em vias bioquímicas complementares, resultando em amplificação da toxicidade observada. A caracterização molecular individual de cada componente, bem como a avaliação combinada de peptídeos purificados, será essencial para determinar se os efeitos registrados decorrem de um único composto ou da interação entre múltiplos agentes tóxicos dentro de cada fração. Além disso, os dados obtidos ressaltam a relevância de discutir as limitações inerentes ao modelo de *T. molitor*. Embora esse organismo seja amplamente reconhecido como uma alternativa ética, econômica e eficaz para triagens iniciais, ele ainda apresenta diferenças metabólicas em relação aos vertebrados. Isso pode limitar a extrapolação direta dos resultados para modelos superiores. No entanto, o uso de *T. molitor* deve ser considerado uma etapa inicial valiosa, especialmente quando alinhado com os princípios dos 3Rs na pesquisa animal: *Replacement*, *Reduction* e *Refinement*.

Também é importante destacar que a separação perfeita observada nos modelos logísticos comparando com o controle é uma limitação estatística relevante, que impediu a estimação precisa de alguns coeficientes. Isso reforça a importância do uso

de análises complementares, como o modelo com F2 como referência, que permitiu revelar padrões de toxicidade relativa entre as frações testados.

A integração desses achados reforça a importância de considerar não apenas os efeitos isolados dos peptídeos, mas também suas interações sinérgicas, tanto no contexto da atividade antioxidante quanto da toxicidade. Isso fortalece a abordagem da triagem funcional, permitindo selecionar frações com perfis de segurança e eficácia mais equilibrados para aplicações tecnológicas futuras.

Apesar das vantagens metodológicas e éticas associadas ao uso de *T. molitor* como modelo invertebrado para triagem toxicológica, é importante destacar que a extrapolação direta dos dados obtidos para organismos vertebrados, incluindo mamíferos, deve ser feita com cautela. Diferenças fisiológicas fundamentais, como vias metabólicas, sistemas de excreção, presença de fígado e rins, e barreiras hematoencefálicas, limitam a previsibilidade completa dos efeitos sistêmicos em modelos superiores (Lagadic; Caquet, 1998). Assim, os dados obtidos neste estudo devem ser considerados preliminares, fornecendo subsídios para priorização de frações com menor toxicidade para estudos subsequentes. Submetendo as frações promissoras a testes complementares em culturas celulares de mamíferos, como fibroblastos ou linhagens hepáticas, bem como, futuramente, em modelos vertebrados mais complexos, com vistas à validação da segurança e elucidação de mecanismos de toxicidade específicos. Este caminho metodológico garantiria uma avaliação mais robusta e translacional da bioatividade dos peptídeos identificados.

Assim, este estudo contribui significativamente para o conhecimento sobre a segurança de frações proteicas de pescado, validando o uso de *T. molitor* como bioindicador eficiente e auxiliando na triagem de peptídeos com potencial aplicação biotecnológica.

5.6. Atividade antimicrobiana

As sete frações obtidas por cromatografia de exclusão molecular (F1 a F7) foram submetidas à avaliação da atividade antimicrobiana frente a três cepas bacterianas padrão: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Os resultados obtidos após 24 horas de incubação a 37 °C estão apresentados na Tabela 5.

Como pode ser visto na Tabela 5, nenhuma das frações avaliadas (F1 a F8) apresentou atividade antimicrobiana detectável nas condições do ensaio de difusão em disco. Após 24 horas de incubação a 37 °C, não foram observados halos de inibição ao redor dos discos impregnados com as frações nas placas inoculadas com *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ou *Pseudomonas aeruginosa*. Em contraste, os discos impregnados com antibióticos comerciais utilizados como controle positivo (cloranfenicol 30 mcg, tetraciclina 30 mcg e ciprofloxacina 5 mcg) apresentaram halos de inibição compatíveis com os perfis esperados para cada cepa, validando a metodologia empregada.

A ausência de halos de inibição nas frações F1 a F7 sugere que, nas concentrações testadas, 30 µg por disco, as frações avaliadas não apresentaram efeito antimicrobiano mensurável contra as cepas bacterianas selecionadas. Este resultado pode estar relacionado a diferentes fatores, como: (I) Baixa concentração de compostos ativos, abaixo do limiar necessário para inibir o crescimento bacteriano; (II) Composição química das frações, possivelmente carente de grupos com ação antibacteriana, como fenóis, alcaloides, flavonoides ou peptídeos antimicrobianos com predominância de resíduos carregados positivamente; (Moore; Payne, 2004). (III) Natureza do método utilizado (difusão em disco), que depende da difusibilidade dos compostos na matriz de ágar — sendo pouco sensível a substâncias de maior peso molecular ou baixa solubilidade em meio aquoso (Bonev; Hooper; Parisot, 2008).

Tabela 5 — Diâmetros dos halos de inibição (mm) de discos embebidos em diferentes frações peptídicas e dispostos em placas inoculadas com diferentes patógenos.

Fração peptídica (30 µg·disco⁻¹)	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
F1	NI	NI	NI
F2	NI	NI	NI
F3	NI	NI	NI
F4	NI	NI	NI
F5	NI	NI	NI
F6	NI	NI	NI
F7	NI	NI	NI

Fonte: Dados da pesquisa.

NI: Ausência de inibição.

a abordagem de valorização de resíduos de tilápia para a extração de proteínas e subsequente obtenção de peptídeos é um excelente exemplo de aplicação da bioquímica para resolver problemas práticos e sustentáveis

Importa ressaltar que as cepas utilizadas neste estudo são linhagens sensíveis, padronizadas para ensaios de triagem. A cepa *S. aureus* ATCC 25923, por exemplo, é suscetível à maioria dos antibióticos, sendo empregada como controle positivo em ensaios de difusão (CLSI, 2023). Portanto, sua não inibição pelas frações testadas é particularmente indicativa da ausência de atividade antibacteriana sob as condições experimentais, uma vez que se esperaria resposta mesmo a compostos com atividade moderada. O mesmo raciocínio se aplica à *E. coli* ATCC 25922, embora essa cepa possua uma parede celular mais complexa e mecanismos de efluxo que dificultam a penetração de compostos de maior massa molecular (Li; Plésiat; Nikaido, 2015; Nikaido, 2003). A cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853, por sua vez, apresenta resistência intrínseca elevada, sendo menos suscetível à maioria dos agentes antimicrobianos convencionais (Breidenstein; de la Fuente-Núñez; Hancock, 2011; Poole, 2001).

Além disto, as amostras contendo peptídeos com massa molecular superior a 10.000 Da possuem difusão restrita no meio de cultura, resultando em ausência de halos de inibição mesmo quando se tem a presença de componentes antimicrobianos (Valgas *et al.*, 2007).

Resultados semelhantes foram relatados por (Ribeiro, 2024), em que frações proteicas provenientes de peróá (*Ballistes capricus*), com aplicação de 30 µg em cada disco, também não apresentaram atividade inibitória, quando testados na forma bruta ou em concentrações reduzidas. Considerando tais limitações, análises complementares, como a determinação da concentração inibitória mínima (MIC) por microdiluição, ou a aplicação de métodos de extração mais seletivos, como o fracionamento cromatográfico, podem ser estratégias úteis para revelar potenciais efeitos ocultos por fatores físico-químicos ou matriz interferente. Assim estes fatores deverão ser investigados a fim determinar a eficiência das frações proteicas em relação a atividade antimicrobiana.

Cabe destacar ainda que, embora algumas dessas frações — especialmente F4, F5 e F6 — tenham demonstrado atividade antioxidante significativa, tal bioatividade não

implica necessariamente em efeito antimicrobiano. Enquanto antioxidantes atuam principalmente na neutralização de espécies reativas de oxigênio (ROS), a atividade antimicrobiana depende de mecanismos distintos, como ruptura de membrana, inibição de enzimas bacterianas ou interferência no DNA microbiano. Além disso, a presença de moléculas de massa superior a 1,5 kDa pode limitar a difusão no meio de cultura, reduzindo a capacidade de formar halos visíveis.

Considerando tais aspectos, futuras investigações devem incluir análises complementares, como o ensaio de microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima (CIM), bem como o uso de técnicas de purificação mais seletivas (ex. HPLC ou ultrafiltração), visando a obtenção de frações com maior potencial antimicrobiano efetivo.

5.7. Integração dos Resultados: Correlação entre Atividade Antioxidante e Toxicidade

A análise comparativa entre as frações F4, F5 e F6 revelou que essas amostras apresentaram os maiores valores de atividade antioxidante, com destaque para F4 ($1933,4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), seguida por F6 ($1546,7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e F5 ($1520,5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), o que sugere forte presença de peptídeos de baixo peso molecular enriquecidos com resíduos como tirosina, triptofano e histidina. Estes aminoácidos são conhecidos por sua capacidade de doação de elétrons e ação quelante sobre íons metálicos pró-oxidantes (Dávalos *et al.*, 2004; Hernández-Ledesma *et al.*, 2005). No entanto, essas mesmas frações também exibiram os maiores níveis de toxicidade em larvas de *Tenébrios*, com mortalidade $\geq 93,3 \%$ nas doses mais elevadas, comportamento compatível com a presença de peptídeos anfipáticos e potencialmente citotóxicos.

Em contraste, a fração F2 demonstrou baixa atividade antioxidante ($717,2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e a menor toxicidade observada, mantendo mortalidade inferior a 40 % mesmo na dose de 80 μg . Este comportamento sugere que os peptídeos presentes em F2 são estruturalmente distintos, possivelmente maiores, menos hidrofóbicos ou menos propensos à interação com membranas celulares, e por isso, menos bioativos e menos tóxicos (Edwards *et al.*, 2016).

Do ponto de vista da aplicação biotecnológica, essa dissociação entre bioatividade e segurança é crucial. Enquanto F4, F5 e F6 são candidatas promissoras para formulações com efeito antioxidante elevado, sua toxicidade exige cuidados adicionais, como purificação subsequente, modificação estrutural (por exemplo: acetilação) ou até encapsulamento para uso tópico controlado. Já a fração F2, com seu perfil de segurança mais favorável, pode ser explorada como ingrediente em formulações alimentares ou cosméticas de uso prolongado, especialmente quando combinada a outros ativos antioxidantes menos agressivos.

Esses achados reforçam a importância de abordagens integradas de triagem, que avaliem simultaneamente a bioatividade desejada e os riscos toxicológicos. A aplicação futura desses peptídeos dependerá do equilíbrio entre eficácia e segurança, além da viabilidade de escalonamento e purificação. Portanto, a continuidade da pesquisa deve incluir a identificação da estrutura primária dos peptídeos ativos e o desenvolvimento de métodos de fracionamento de maior resolução, como HPLC.

6. CONCLUSÃO

As vísceras de tilápia (*Oreochromis spp.*), frequentemente descartadas como subproduto da indústria aquícola, constituem uma fonte viável e promissora para a obtenção de peptídeos com potencial bioativo. O protocolo de extração e purificação adotado permitiu o fracionamento eficiente do extrato proteico, resultando em sete frações distintas (F1–F7), posteriormente avaliadas quanto às suas atividades antioxidante, antimicrobiana e toxicológica.

As frações F4, F5 e F6 destacaram-se por apresentarem elevada atividade antioxidante, atingindo valores superiores a $1500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em equivalentes de Trolox no ensaio de captura do radical $\text{ABTS}\cdot^+$. A eficácia antioxidante observada está possivelmente relacionada à presença de peptídeos de baixo peso molecular contendo resíduos de aminoácidos funcionalmente relevantes, como tirosina, histidina e triptofano, conhecidos por sua capacidade de doação de elétrons e quelação de metais pró-oxidantes.

A avaliação toxicológica em larvas de *Tenebrio molitor* revelou perfis distintos de toxicidade entre as frações. As frações F4, F5 e F6 apresentaram elevada letalidade em doses mais altas ($80 \mu\text{g}$), evidenciando um possível sinergismo entre peptídeos presentes. Em contraste, a fração F2 demonstrou baixa toxicidade mesmo nas maiores doses testadas, sendo considerada a mais segura dentre todas as analisadas. A análise estatística por regressão logística binomial (GLM) confirmou efeitos dependentes de dose, tempo e interação entre frações, corroborando a sensibilidade do modelo de inseto como triagem toxicológica alternativa dentro dos princípios dos 3Rs.

Por outro lado, nenhuma das frações avaliadas apresentou atividade antimicrobiana mensurável contra as cepas bacterianas testadas (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*). Este resultado pode ser atribuído à baixa difusibilidade dos compostos no meio de ágar, à ausência de grupos químicos com atividade antimicrobiana ou ainda à predominância de peptídeos com massa molecular acima de 1,5 kDa, faixa pouco compatível com o mecanismo de ação antimicrobiano em ensaios de contato superficial.

Diante dos dados obtidos, conclui-se que as vísceras de tilápia representam uma matéria-prima sustentável para a obtenção de peptídeos com atividade antioxidante, com potencial aplicação nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética. A fração F2, em especial, apresenta-se como candidata promissora para uso funcional devido à combinação de baixa toxicidade e razoável capacidade antioxidante. As evidências geradas reforçam a viabilidade do reaproveitamento de resíduos pesqueiros, contribuindo para a valorização de subprodutos e promovendo práticas alinhadas à economia circular.

Futuros estudos devem focar na identificação estrutural dos peptídeos mais ativos por técnicas de espectrometria de massas e na investigação de suas propriedades funcionais em modelos celulares e animais, a fim de validar seu uso seguro e eficaz em formulações biotecnológicas avançadas.

7. REFERÊNCIAS

- ABD EL-HACK, M. E.; EL-SAADONY, M. T.; NADER, M. M.; SALEM, H. M.; EL-TAHAN, A. M.; SOLIMAN, S. M.; KHAFAGA, A. F. Effect of environmental factors on growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **International Journal of Biometeorology**, [s. l.], vol. 66, nº 11, p. 2183–2194, 1 nov. 2022. <https://doi.org/10.1007/S00484-022-02347-6/FIGURES/3>.
- AGOSTINHO, A. A.; VITORINO JÚNIOR, O. B.; PELICICE, F. M. Riscos ambientais do cultivo de tilápia em tanques redes. **Boletim SBI**, [s. l.], vol. 124, nº 1, p. 2–9, 2018. .
- AGUIAR, G. P. S.; LIMBERGER, G. M.; DA SILVEIRA, É. L. Alternativas tecnológicas para o aproveitamento de resíduos provenientes da industrialização de pescados. **Interdisciplinar: Revista eletrônica da UNIVAR**, [s. l.], vol. 11, p. 225–229, 2014. .
- AKULLO, D.; KIGOZI, J.; MUYONGA, J. H. Nutritional, sensory and shelf life quality of tilapia and Nile perch sausages enriched with fish bone soup. **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**, [s. l.], vol. 8, p. 646–653, 2020. .
- ARNAO, M. B.; CANO, A.; ACOSTA, M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. **Food Chemistry**, [s. l.], vol. 73, nº 2, p. 239–244, maio 2001. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00324-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00324-1).
- ASKE, K. C.; WAUGH, C. A. Expanding the 3R principles. **EMBO reports**, [s. l.], vol. 18, nº 9, p. 1490–1492, 25 set. 2017. <https://doi.org/10.15252/embr.201744428>.
- BECHTEL, P. J. Properties of different fish processing by-products from pollock, cod and salmon. **Journal of Food Processing and Preservation**, [s. l.], vol. 27, nº 2, p. 101–116, 1 jun. 2003. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2003.tb00505.x>.
- BHASKAR, N.; BENILA, T.; RADHA, C.; LALITHA, R. G. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. **Bioresource Technology**, [s. l.], vol. 99, nº 2, p. 335–343, 1 jan. 2008. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2006.12.015>.
- BONEV, B.; HOOPER, J.; PARISOT, J. Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], vol. 61, nº 6, p. 1295–1301, 13 mar. 2008. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn090>.

BONNER, P. L. R. Non-Absorption Techniques for Purifying Proteins. **Protein Purification**. Second. Boca Raton: Taylor & Francis, 2018. p. 177–191.

BORGES, A. M. **Criação de tilápias**. 2º ed. Brasília: Emater, 2009.

BOUGATEF, A.; NEDJAR-ARROUME, N.; MANNI, L.; RAVALLEC, R.; BARKIA, A.; GUILLOCHON, D.; NASRI, M. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. **Food Chemistry**, [s. l.], vol. 118, nº 3, p. 559–565, fev. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.021>.

BRAGA, L. L. V. de M.; SIMÃO, G.; SCHIEBEL, C. S.; OLIVEIRA, Y. F.; DA ROSA, L. B.; GOIS, M. B.; FERNANDES, E. S.; MARIA-FERREIRA, D. Tenebrio molitor as a new alternative model for the investigation of chemotherapy-induced intestinal toxicity. **Pharmacological Research - Reports**, [s. l.], vol. 2, p. 100013, mar. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.prerep.2024.100013>.

BRAI, A.; POGGIALINI, F.; VAGAGGINI, C.; PASQUALINI, C.; SIMONI, S.; FRANCARDI, V.; DREASSI, E. Tenebrio molitor as a Simple and Cheap Preclinical Pharmacokinetic and Toxicity Model. **International Journal of Molecular Sciences 2023, Vol. 24, Page 2296**, [s. l.], vol. 24, nº 3, p. 2296, 24 jan. 2023. <https://doi.org/10.3390/IJMS24032296>.

BRASIL DEPARTAMENTO NACIONAL DE OBRAS CONTRA AS SECAS. Tilápia: conheça a versatilidade desse peixe de água doce. 14 set. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/dnocs/pt-br/assuntos/noticias/tilapia-conheca-a-versatilidade-desse-peixe-de-agua-doce>. Acessado em: 28 maio 2025.

BRAUNGART, M. ; M. W. **Cradle to Cradle: criar e reciclar ilimitadamente**. São Paulo: Gustavo Gili Brasil, 2013. . Acessado em: 28 maio 2024.

BRAUNGART, M.; MCDONOUGH, W.; BOLLINGER, A. Cradle-to-cradle design: creating healthy emissions - a strategy for eco-effective product and system design. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], vol. 15, nº 13–14, p. 1337–1348, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2006.08.003>. Acessado em: 28 maio 2024.

BREIDENSTEIN, E. B. M.; DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C.; HANCOCK, R. E. W. Pseudomonas aeruginosa: all roads lead to resistance. **Trends in Microbiology**, [s. l.], vol. 19, nº 8, p. 419–426, ago. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.04.005>.

BUNERI, I. D.; YOUSUF, M.; ATTAULLAH, M.; AFRIDI, S.; ANJUM, S. I.; RANA, H.; AHMAD, N.; AMIN, M.; TAHIR, M.; ANSARI, M. J. A comparative toxic effect of Cedrus deodara oil on larval protein contents and its behavioral effect on larvae of mealworm beetle (Tenebrio

molitor) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Saudi Journal of Biological Sciences**, [s. l.], vol. 26, n° 2, p. 281–285, fev. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.06.005>.

CHEN, H.-M.; MURAMOTO, K.; YAMAUCHI, F.; FUJIMOTO, K.; NOKIHARA, K. Antioxidative Properties of Histidine-Containing Peptides Designed from Peptide Fragments Found in the Digests of a Soybean Protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], vol. 46, n° 1, p. 49–53, 1 jan. 1998. <https://doi.org/10.1021/jf970649w>.

CHEN, J.; LI, L.; YI, R.; XU, N.; GAO, R.; HONG, B. Extraction and characterization of acid-soluble collagen from scales and skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*). **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], vol. 66, p. 453–459, 1 mar. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.070>.

CHI, C.-F.; WANG, B.; DENG, Y.-Y.; WANG, Y.-M.; DENG, S.-G.; MA, J.-Y. Isolation and characterization of three antioxidant pentapeptides from protein hydrolysate of monkfish (*Lophius litulon*) muscle. **Food Research International**, [s. l.], vol. 55, p. 222–228, jan. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.11.018>.

CNI, C. N. da I. **Sustentabilidade & liderança industrial**. Brasília: [s. n.], 2022. Disponível em: https://static.portaldaindustria.com.br/portaldaindustria/noticias/media/filer_public/a6/d9/a6d9ab25-e8e6-4c17-a0fb-58249c4b5594/pesquisa_sustentabilidade_e_lideranca_empresarial_cop27.pdf. Acessado em: 9 maio 2024.

CUMMINGS, R. D.; KORNFIELD, S. Characterization of the structural determinants required for the high affinity interaction of asparagine-linked oligosaccharides with immobilized *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinating and erythroagglutinating lectins. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], vol. 257, n° 19, p. 11230–11234, 1982. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)33746-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)33746-3).

DÁVALOS, A.; MIGUEL, M.; BARTOLOMÉ, B.; LÓPEZ-FANDIÑO, R. Antioxidant Activity of Peptides Derived from Egg White Proteins by Enzymatic Hydrolysis. **Journal of Food Protection**, [s. l.], vol. 67, n° 9, p. 1939–1944, set. 2004. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.9.1939>.

DING, M.-Q.; DING, J.; ZHANG, Z.-R.; LI, M.-X.; CUI, C.-H.; PANG, J.-W.; XING, D.-F.; REN, N.-Q.; WU, W.-M.; YANG, S.-S. Biodegradation of various grades of polyethylene microplastics by *Tenebrio molitor* and *Tenebrio obscurus* larvae: Effects on their physiology. **Journal of Environmental Management**, [s. l.], vol. 358, p. 120832, maio 2024. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2024.120832>.

DONG, S.; ZENG, M.; WANG, D.; LIU, Z.; ZHAO, Y.; YANG, H. Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). **Food Chemistry**, [s. l.], vol. 107, n° 4, p. 1485–1493, 15 abr. 2008. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2007.10.011>.

EDWARDS, I. A.; ELLIOTT, A. G.; KAVANAGH, A. M.; ZUEGG, J.; BLASKOVICH, M. A. T.; COOPER, M. A. Contribution of Amphipathicity and Hydrophobicity to the Antimicrobial Activity and Cytotoxicity of β -Hairpin Peptides. **ACS Infectious Diseases**, [s. l.], vol. 2, n° 6, p. 442–450, 10 jun. 2016. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.6b00045>.

EL-RASHIDY, A. A.; GAD, A.; ABU-HUSSEIN, A. E. H. G.; HABIB, S. I.; BADR, N. A.; HASHEM, A. A. Chemical and biological evaluation of Egyptian Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fish scale collagen. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], vol. 79, p. 618–626, 1 ago. 2015. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2015.05.019>.

ENE, S. A.; TEODOSIU, C.; ROBU, B.; VOLF, I. Water footprint assessment in the winemaking industry: a case study for a Romanian medium size production plant. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], vol. 43, p. 122–135, 2013. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2012.11.051>.

FELTES, M. M. C.; CORREIA, J. F. G.; BEIRÃO, L. H.; BLOCK, J. M.; NINOW, J. L.; SPILLER, V. R. Alternativas para a agregação de valor aos resíduos da industrialização de peixe. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, [s. l.], vol. 14, n° 6, p. 669–677, 2010. <https://doi.org/10.1590/S1415-43662010000600014>.

FOGAÇA, F. H. dos S.; OTANI, F. S.; PORTELLA, C. D. G.; SANTOS-FILHO, L. G. A. dos; SANT'ANA, L. S. Caracterização de surimi obtido a partir da carne mecanicamente separada de tilápia do Nilo e elaboração de fishburger. **Semina: Ciências Agrárias**, [s. l.], vol. 36, n° 2, p. 765–776, 22 abr. 2015. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2015v36n2p765>.

FONG-IN, S.; PHOSRI, P.; SUTTIPRAPA, S.; PIMPANGAN, T.; UTAMA-ANG, N. Effect of Substitution of Wheat Flour with Nile Tilapia Bone Powder on The Quality Characteristics of Cashew Nut Cookies. **Chiang Mai University Journal of Natural Sciences**, [s. l.], vol. 19, n° 4, set. 2020. <https://doi.org/10.12982/CMUJNS.2020.0062>.

FREITAS, J. V. F.; GURGEL, J. J. S. Estudos experimentais sobre a conservação da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L. 1766) . **Boletim Técnico do Departamento Nacional de Obras Contra Secas** , [s. l.], vol. 42, p. 153–178, 1984. .

GUSAIN, D.; SHARMA, I.; DIXIT, V. P. Antiatherosclerotic effects of fish extract feeding in rabbits. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], vol. 41, n° 1–2, p. 59–63, jan. 1994. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(94\)90058-2](https://doi.org/10.1016/0378-8741(94)90058-2).

HAMED, H. S.; EL-SAYED, Y. S. Antioxidant activities of Moringa oleifera leaf extract against pendimethalin-induced oxidative stress and genotoxicity in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Fish Physiology and Biochemistry**, [s. l.], vol. 45, n° 1, p. 71–82, 7 fev. 2019. <https://doi.org/10.1007/s10695-018-0535-8>.

HAQUE, E.; CHAND, R.; KAPILA, S. Biofunctional Properties of Bioactive Peptides of Milk Origin. **Food Reviews International**, [s. l.], vol. 25, n° 1, p. 28–43, 22 dez. 2008. <https://doi.org/10.1080/87559120802458198>.

HE, S.; FRANCO, C.; ZHANG, W. Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). **Food Research International**, [s. l.], vol. 50, n° 1, p. 289–297, 1 jan. 2013. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2012.10.031>.

HELMERHORST, E.; STOKES, G. B. Microcentrifuge desalting: A rapid, quantitative method for desalting small amounts of protein. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], vol. 104, n° 1, p. 130–135, 1980. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697\(80\)90287-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90287-0).

HEMUNG, B.-O. Properties of tilapia bone powder and its calcium bioavailability based on transglutaminase assay. **International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics**, [s. l.], vol. 3, n° 4, p. 306, 2013. .

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; DÁVALOS, A.; BARTOLOMÉ, B.; AMIGO, L. Preparation of Antioxidant Enzymatic Hydrolysates from α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin. Identification of Active Peptides by HPLC-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], vol. 53, n° 3, p. 588–593, 1 fev. 2005. <https://doi.org/10.1021/jf048626m>.

HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, F.; AGUILERA-MORALES, M. E. Nutritional richness and importance of the consumption of tilapia in the Papaloapan Region. **Revista Electrónica De Veterinaria**, [s. l.], vol. 13, n° 6, p. 1–12, 2012. .

HSU, K.-C.; LU, G.-H.; JAO, C.-L. Antioxidative properties of peptides prepared from tuna cooking juice hydrolysates with orientase (*Bacillus subtilis*). **Food Research International**, [s. l.], vol. 42, n° 5–6, p. 647–652, jun. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.02.014>.

HUANG, J. X.; GUIOCHON, G. Applications of preparative high-performance liquid chromatography to the separation and purification of peptides and proteins. **Journal of**

Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, [s. l.], vol. 492, n° C, p. 431–467, 8 ago. 1989. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)84477-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)84477-1). Acessado em: 27 maio 2024.

JANKOVIĆ-TOMANIĆ, M.; PETKOVIĆ, B.; TODOROVIĆ, D.; VRANKOVIĆ, J.; PERIĆ-MATARUGA, V. Physiological and behavioral effects of the mycotoxin deoxynivalenol in *Tenebrio molitor* larvae. **Journal of Stored Products Research**, [s. l.], vol. 83, p. 236–242, 1 set. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2019.07.008>.

JANKOVIĆ-TOMANIĆ, M.; PETKOVIĆ, B.; VRANKOVIĆ, J. S.; PERIĆ-MATARUGA, V. Effects of high doses of zearalenone on some antioxidant enzymes and locomotion of *Tenebrio molitor* larvae (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Insect Science**, [s. l.], vol. 24, n° 3, 1 maio 2024. <https://doi.org/10.1093/jisesa/ieae052>.

JE, J.-Y.; QIAN, Z.-J.; BYUN, H.-G.; KIM, S.-K. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. **Process Biochemistry**, [s. l.], vol. 42, n° 5, p. 840–846, maio 2007. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.02.006>.

KALMYKOVA, Y.; SADAGOPAN, M.; ROSADO, L. Circular economy - From review of theories and practices to development of implementation tools. **Resources, Conservation and Recycling**, [s. l.], vol. 135, p. 190–201, 1 ago. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2017.10.034>. Acessado em: 28 maio 2024.

KECHAOU, E. S.; DUMAY, J.; DONNAY-MORENO, C.; JAOUEN, P.; GOUYGOU, J. P.; BERGÉ, J. P.; AMAR, R. Ben. Enzymatic hydrolysis of cuttlefish (*Sepia officinalis*) and sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using commercial proteases: Effects on lipid distribution and amino acid composition. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [s. l.], vol. 107, n° 2, p. 158–164, 1 fev. 2009. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOSC.2008.10.018>.

KISHIMURA, H.; HAYASHI, K. Isolation and characteristics of trypsin from pyloric ceca of the starfish *Asterina pectinifera*. **Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology**, [s. l.], vol. 132 2, p. 485–90, 2002. .

KITTS, D.; WEILER, K. Bioactive Proteins and Peptides from Food Sources. Applications of Bioprocesses used in Isolation and Recovery. **Current Pharmaceutical Design**, [s. l.], vol. 9, n° 16, p. 1309–1323, 1 jun. 2003. <https://doi.org/10.2174/1381612033454883>.

KLOMPONG, V.; BENJAKUL, S.; KANTACHOTE, D.; SHAHIDI, F. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. **Food Chemistry**, [s. l.], vol. 102, n° 4, p. 1317–1327, 1 jan. 2007. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2006.07.016>.

KONO, Y.; SHIBATA, H.; KODAMA, Y.; SAWA, Y. The suppression of the N-nitrosating reaction by chlorogenic acid. **Biochemical Journal**, [s. l.], vol. 312, n° 3, p. 947–953, 15 dez. 1995. <https://doi.org/10.1042/bj3120947>.

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Fish protein hydrolysates: Production, biochemical, and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. l.], vol. 40, n° 1, p. 43–81, 2000. <https://doi.org/10.1080/10408690091189266;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER>.

LAGADIC, L.; CAQUET, T. Invertebrates in testing of environmental chemicals: are they alternatives? **Environmental Health Perspectives**, [s. l.], vol. 106, n° suppl 2, p. 593–611, abr. 1998. <https://doi.org/10.1289/ehp.98106593>.

LEMES, A. C.; SALA, L.; ORES, J. D. C.; BRAGA, A. R. C.; EGEA, M. B.; FERNANDES, K. F. A Review of the Latest Advances in Encrypted Bioactive Peptides from Protein-Rich Waste. **International Journal of Molecular Sciences** 2016, Vol. 17, Page 950, [s. l.], vol. 17, n° 6, p. 950, 16 jun. 2016. <https://doi.org/10.3390/IJMS17060950>.

LI, X.-Z.; PLÉSIAT, P.; NIKAIDO, H. The Challenge of Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], vol. 28, n° 2, p. 337–418, abr. 2015. <https://doi.org/10.1128/CMR.00117-14>.

LIMA VERDE, M. E. Q.; FERREIRA-JÚNIOR, A. E. C.; DE BARROS-SILVA, P. G.; MIGUEL, E. de C.; MATHOR, M. B.; LIMA-JÚNIOR, E. M.; DE MORAES-FILHO, M. O.; ALVES, A. P. N. N. Nile tilapia skin (*Oreochromis niloticus*) for burn treatment: ultrastructural analysis and quantitative assessment of collagen. **Acta Histochemica**, [s. l.], vol. 123, n° 6, p. 151762, 1 set. 2021. <https://doi.org/10.1016/J.ACTHIS.2021.151762>.

MA, Y.; ZHANG, D.; LIU, M.; LI, Y.; LV, R.; LI, X.; WANG, Q.; REN, D.; WU, L.; ZHOU, H. Identification of Antioxidant Peptides Derived from Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Skin and Their Mechanism of Action by Molecular Docking. **Foods**, [s. l.], vol. 11, n° 17, p. 2576, 1 set. 2022. <https://doi.org/10.3390/FOODS11172576/S1>.

MARQUES, I.; BOTELHO, G.; GUINÉ, R. Comparative study on nutritional composition of fish available in Portugal. **Nutrition and Food Science**, [s. l.], vol. 49, n° 5, p. 925–941, 3 set. 2019. <https://doi.org/10.1108/NFS-11-2018-0311/FULL/XML>. Acessado em: 28 maio 2025.

MARTÍNEZ, L. C.; PLATA-RUEDA, A.; COLARES, H. C.; CAMPOS, J. M.; DOS SANTOS, M. H.; FERNANDES, F. L.; SERRÃO, J. E.; ZANUNCIO, J. C. Toxic effects of two essential oils and their

constituents on the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. **Bulletin of Entomological Research**, [s. l.], vol. 108, n° 6, p. 716–725, 1 dez. 2018. <https://doi.org/10.1017/S0007485317001262>.

MELO, E. F. de. **Biocomposites of skin gelatine and hydroxyapatite of waste scraps from the benefit of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)**. 2024. 1–90 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2024.

MILIUTE-PLEPIENE, J. Bio-Degradable Waste and By-Products from Food Industry Management Systems in Lithuania: Analysis, Problems and Improvement Possibilities. **Environmental Research, Engineering and Management**, [s. l.], vol. 4, p. 60–69, maio 2007. .

MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M. J.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. A Novel Method for Measuring Antioxidant Capacity and its Application to Monitoring the Antioxidant Status in Premature Neonates. **Clinical Science**, [s. l.], vol. 84, n° 4, p. 407–412, 1 abr. 1993. <https://doi.org/10.1042/cs0840407>.

MJOUN, K.; ROSENTRATER, K.; BROWN, M. L. TILAPIA: Environmental Biology and Nutritional Requirements. [s. l.], 2010. .

MOLDES, A. B.; VECINO, X.; CRUZ, J. M. Nutraceuticals and Food Additives. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Food and Beverages Industry**, [s. l.], , p. 143–164, 1 jan. 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63666-9.00006-6>.

MÖLLER, N. P.; SCHOLZ-AHRENS, K. E.; ROOS, N.; SCHREZENMEIR, J. Bioactive peptides and proteins from foods: Indication for health effects. **European Journal of Nutrition**, [s. l.], vol. 47, n° 4, p. 171–182, 27 jun. 2008. <https://doi.org/10.1007/S00394-008-0710-2/METRICS>.

MONTEIRO, M. L. G.; MÁRSICO, E. T.; SOARES, M. S.; DELIZA, R.; DE OLIVEIRA, D. C. R.; CONTE-JUNIOR, C. A. Tilapia-waste flour as a natural nutritional replacer for bread: A consumer perspective. **PLOS ONE**, [s. l.], vol. 13, n° 5, p. e0196665, 1 maio 2018. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0196665>.

MONTOYA-MEJÍA, M.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, H.; NOLASCO-SORIA, H. Circadian cycle of digestive enzyme production at fasting and feeding conditions in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Actinopterygii: Perciformes: Cichlidae). **Acta Ichthyologica et Piscatoria**, [s. l.], vol. 46, n° 3, p. 163–170, 2016. <https://doi.org/10.3750/AIP2016.46.3.01>.

MOORE, S. L.; PAYNE, D. N. Type of antimicrobial agents. *In*: FRAISE, A. P.; LAMBERT, P. A.; MAILLARD, J.-Y. (orgs.). **Russell, Hugo & Ayliffe's Principles and practice of disinfection, preservation & sterilization**. 4^o ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2004. p. 8–97.

MORO, G. V.; RODRIGUES, A. P. O.; TORATI, L. S.; BARROSO, R. M.; LUNDSTEDT, L. M. Anatomia e fisiologia de peixes de água doce. *In*: RODRIGUES, A. P. O.; LIMA, A. F.; ALVES, A. L.; ROSA, D. K.; TORATI, L. S.; SANTOS, V. R. V. dos (orgs.). **Piscicultura de água doce - Multiplicando conhecimentos**. Brasília: Embrapa, 2013. p. 71–95.

NGO, D.-H.; QIAN, Z.-J.; RYU, B.; PARK, J. W.; KIM, S.-K. In vitro antioxidant activity of a peptide isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) scale gelatin in free radical-mediated oxidative systems. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], vol. 2, n^o 2, p. 107–117, abr. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2010.02.001>.

NIKAIDO, H. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [s. l.], vol. 67, n^o 4, p. 593–656, dez. 2003. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.593-656.2003>.

OLSEN, R. L.; TOPPE, J.; KARUNASAGAR, I. Challenges and realistic opportunities in the use of by-products from processing of fish and shellfish. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], vol. 36, n^o 2, p. 144–151, 2014. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.01.007>.

PARK, I.-K.; LEE, S.-G.; CHOI, D.-H.; PARK, J.-D.; AHN, Y.-J. Insecticidal activities of constituents identified in the essential oil from leaves of *Chamaecyparis obtusa* against *Callosobruchus chinensis* (L.) and *Sitophilus oryzae* (L.). **Journal of Stored Products Research**, [s. l.], vol. 39, n^o 4, p. 375–384, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0022-474X\(02\)00030-9](https://doi.org/10.1016/S0022-474X(02)00030-9).

PATCHIMPET, J.; SANGKHARAK, K.; KLOMKLAO, S. Lipolytic activity of viscera extract from three freshwater fish species in Phatthalung, Thailand: Comparative studies and potential use as dishwashing detergent additive. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], vol. 19, p. 101143, 2019. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101143>.

PEIXE BR, A. B. de P. **Anuário Brasileiro da Piscicultura PEIXE BR 2025**. São Paulo: [s. n.], 2025.

PICKLER, E.; JOSÉ, S.; RIBEIRO, E.; FILHO, V. **Evolução da piscicultura no brasil: Diagnóstico e desenvolvimento da cadeia produtiva de tilápia**. 2328^o ed. Brasília: Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada, 2017. . Acessado em: 26 maio 2025.

POOLE, K. Multidrug resistance in Gram-negative bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, [s. l.], vol. 4, n° 5, p. 500–508, 1 out. 2001. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00242-3](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00242-3).

RAJAPAKSE, N.; MENDIS, E.; BYUN, H.-G.; KIM, S.-K. Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, [s. l.], vol. 16, n° 9, p. 562–569, set. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.02.005>.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], vol. 26, n° 9–10, p. 1231–1237, maio 1999. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3). Acessado em: 27 maio 2024.

REIKE, D.; VERMEULEN, W. J. V.; WITJES, S. The circular economy: New or Refurbished as CE 3.0? — Exploring Controversies in the Conceptualization of the Circular Economy through a Focus on History and Resource Value Retention Options. **Resources, Conservation and Recycling**, [s. l.], vol. 135, p. 246–264, 1 ago. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2017.08.027>. Acessado em: 28 maio 2024.

REN, J.; ZHAO, M.; SHI, J.; WANG, J.; JIANG, Y.; CUI, C.; KAKUDA, Y.; XUE, S. J. Purification and identification of antioxidant peptides from grass carp muscle hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. **Food Chemistry**, [s. l.], vol. 108, n° 2, p. 727–736, maio 2008. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.010>.

RIBEIRO, M. L. **Avaliação do potencial bioativo de frações peptídicas de coprodutos de peroá (Balistes capriscus)**. 2024. 137 f. Tese (doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2024.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N. J. Antioxidants – the case for fruit and vegetables in the diet. **British Food Journal**, [s. l.], vol. 97, n° 9, p. 35–40, out. 1995. <https://doi.org/10.1108/00070709510100163>.

RIYADI, P. H.; ATHO'ILLAH, M. F.; TANOD, W. A.; RAHMAWATI, I. S. Tilapia viscera hydrolysate extract alleviates oxidative stress and renal damage in deoxycorticosterone acetate-salt-induced hypertension rats. **Veterinary World**, [s. l.], vol. 13, n° 11, p. 2477, 1 nov. 2020. <https://doi.org/10.14202/VETWORLD.2020.2477-2483>.

RIYADI, P. H.; TANOD, W. A.; SULISTIYATI, D. T.; AULANNI'AM, A.; SUPRAYITNO, E. Effects of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) viscera hydrolyzate on blood pressure, TNF- α and IL-6 expression in rats (*Rattus norvegicus*) induced by DOCA-Salt. **Indian Journal of Animal**

Research, [s. l.], vol. 55, nº 1, p. 19–24, 1 fev. 2021. <https://doi.org/10.18805/IJAR.B-1195>. Acessado em: 28 maio 2025.

ROTTA, M. A. **Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo dos peixes relacionados à piscicultura**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2003.

RUFINO, M. D. S. M.; ALVES, R. E.; DE BRITO, E. S.; DE MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. de G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SUARA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical ABTS+. **Embrapa Agroindústria Tropical**, Fortaleza, nº Comunicado Técnico, 128, p. 1–4, jul. 2007. .

RUSSEL, W. M. S.; BURCH, R. L. **The Principles of Humane Experimental Technique**. London: Methuen & Co. Limited, 1959. vol. 1, . <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.1960.tb73127.x>.

SALAH, N.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G.; TIJBURG, L.; BOLWELL, G. P.; RICEEVANS, C. Polyphenolic Flavanols as Scavengers of Aqueous Phase Radicals and as Chain-Breaking Antioxidants. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], vol. 322, nº 2, p. 339–346, out. 1995. <https://doi.org/10.1006/abbi.1995.1473>.

SALWANEE, S.; WAN AIDA, . M; MAMOT, S.; MASKAT, M. Y.; IBRAHIM, S. Effects of Enzyme Concentration, Temperature, pH and Time on the Degree of Hydrolysis of Protein Extract from Viscera of Tuna (*Euthynnus affinis*) by Using Alcalase. **Sains Malaysiana**, [s. l.], vol. 42, nº 3, p. 279–287, 2013. . Acessado em: 29 maio 2025.

SAMARANAYAKA, A. G. P.; KITTS, D. D.; LI-CHAN, E. C. Y. Antioxidative and Angiotensin-I-Converting Enzyme Inhibitory Potential of a Pacific Hake (*Merluccius productus*) Fish Protein Hydrolysate Subjected to Simulated Gastrointestinal Digestion and Caco-2 Cell Permeation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], vol. 58, nº 3, p. 1535–1542, 10 fev. 2010. <https://doi.org/10.1021/jf9033199>.

SÁNCHEZ, A.; VÁZQUEZ, A. Bioactive peptides: A review. **Food Quality and Safety**, [s. l.], vol. 1, nº 1, p. 29–46, 1 mar. 2017. <https://doi.org/10.1093/fqs/fyx006>.

SAOUDI, M.; ABDELMOULEH, A.; JAMOSSI, K.; KAMMOUN, A.; EL FEKI, A. Hematological Toxicity Associated with Tissue Extract from Poisonous Fish *Lagocephalus lagocephalus* — Influence on Erythrocyte Function in Wistar Rats. **Journal of Food Science**, [s. l.], vol. 73, nº 7, 2 set. 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00885.x>.

SARMADI, B. H.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: A review. **Peptides**, [s. l.], vol. 31, nº 10, p. 1949–1956, out. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.06.020>.

SCOTT, S. L.; CHEN, W. J.; BAKAC, A.; ESPENSON, J. H. Spectroscopic parameters, electrode potentials, acid ionization constants, and electron exchange rates of the 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) radicals and ions. **The Journal of Physical Chemistry**, [s. l.], vol. 97, p. 6710–6714, 1993. .

SEABOLD, S.; PERKTOLD, J. statsmodels: Econometric and statistical modeling with python. 2010. **9th Python in Science Conference** [...]. [S. l.: s. n.], 2010.

ŠLIŽYTE, R.; DAUKŠAS, E.; FALCH, E.; STORRØ, I.; RUSTAD, T. Characteristics of protein fractions generated from hydrolysed cod (*Gadus morhua*) by-products. **Process Biochemistry**, [s. l.], vol. 40, n° 6, p. 2021–2033, 1 maio 2005.
<https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2004.07.016>.

SOCHOR, J.; RYVOLOVA, M.; KRYSOFOVA, O.; SALAS, P.; HUBALEK, J.; ADAM, V.; TRNKOVA, L.; HAVEL, L.; BEKLOVA, M.; ZEHNALÉK, J.; PROVAZNIK, I.; KIZEK, R. Fully Automated Spectrometric Protocols for Determination of Antioxidant Activity: Advantages and Disadvantages. **Molecules**, [s. l.], vol. 15, n° 12, p. 8618–8640, 29 nov. 2010.
<https://doi.org/10.3390/molecules15128618>.

SOUZA, M. L. R. de; MARANHÃO, T. C. F. Rendimento de carcaça, filé e subprodutos da filetagem da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L), em função do peso corporal . **Acta Scientiarum**, [s. l.], vol. 23, n° 4, p. 897–901, 2001. .

SPRAGUE, M.; FAWCETT, S.; BETANCOR, M. B.; STRUTHERS, W.; TOCHER, D. R. Variation in the nutritional composition of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fillets with emphasis on EPA and DHA contents. **Journal of Food Composition and Analysis**, [s. l.], vol. 94, p. 103618, 1 dez. 2020. <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2020.103618>.

STÅHLBERG, J.; JÖNSSON, B.; HORVÁTH, C. Theory for Electrostatic Interaction Chromatography of Proteins. **Analytical Chemistry**, [s. l.], vol. 63, n° 17, p. 1867–1874, 1 set. 1991. <https://doi.org/10.1021/ac00017a036>. Acessado em: 27 maio 2024.

STOSCHECK, C. M. Quantitation of protein. In: DEUTSCHER, M. P. (org.). **Methods in Enzymology: Guide to Protein Purification**. Hardcover. Cambridge: Academic Press, 1990. vol. 182, p. 50–68. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)82008-P](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)82008-P).

SUN, M.; ZHAO, X.; LUO, S.; JIANG, M.; LIU, Q.; CAO, Y. The Development of Yellow Mealworm (*Tenebrio molitor*) as a Cheap and Simple Model to Evaluate Acute Toxicity, Locomotor Activity Changes, and Metabolite Profile Alterations Induced by Nanoplastics of

Different Sizes. **Journal of Applied Toxicology**, [s. l.], 1 jun. 2025.
<https://doi.org/10.1002/JAT.4764>. Acessado em: 1 jun. 2025.

SUPRAYITNO, E.; AULANNI'AM, A.; SULISTYATI, T. D.; RIYADI, P. H. Chemical Characteristics and Amino Acids Profile of Protein Hydrolysates of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Viscera. **Journal of World's Poultry Research**, [s. l.], vol. 9, n° 4, p. 324–328, 25 dez. 2019.
<https://doi.org/10.36380/scil.2019.wvj41>.

TAHERI, A.; ANVAR, S. A. A.; AHARI, H.; FOGLIANO, V. Comparison the functional properties of protein Hydrolysates from poultry byproducts and rainbow trout. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, [s. l.], vol. 12, n° 1, p. 154–169, 2013.
<https://doi.org/10.18869/ACADPUB.IJFS>.

TÖRNQVIST, E.; ANNAS, A.; GRANATH, B.; JALKESTEN, E.; COTGREAVE, I.; ÖBERG, M. Strategic Focus on 3R Principles Reveals Major Reductions in the Use of Animals in Pharmaceutical Toxicity Testing. **PLoS ONE**, [s. l.], vol. 9, n° 7, p. e101638, 23 jul. 2014.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101638>.

TREWAVAS, Ethelwynn. Tilapiine fishes of the genera *Sarotherodon*, *Oreochromis*, and *Danakilia*. **Publication (British Museum (Natural History))**, no. 878, [s. l.], 3 jan. 1983.
<https://doi.org/10.5962/BHL.TITLE.123198>. Acessado em: 26 maio 2025.

TSUMOTO, K.; EJIMA, D.; SENCZUK, A. M.; KITA, Y.; ARAKAWA, T. Effects of Salts on Protein-Surface Interactions: Applications for Column Chromatography. **Pharmacists Association J Pharm Sci**, [s. l.], vol. 96, p. 1677–1690, 2007. DOI 10.1002/jps.20821. Disponível em:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jps.20821>. Acessado em: 27 maio 2024.

VALGAS, C.; SOUZA, S. M. de; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA JR., A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], vol. 38, n° 2, p. 369–380, jun. 2007. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000200034>.

VAN DEN BERG, R.; HAENEN, G. R. M. M.; VAN DEN BERG, H.; BAST, A. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. **Food Chemistry**, [s. l.], vol. 66, n° 4, p. 511–517, set. 1999. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00089-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00089-8). Acessado em: 27 maio 2024.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R. L. Total Antioxidant Capacity of Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], vol. 44, n° 3, p. 701–705, 1 jan. 1996.
<https://doi.org/10.1021/jf950579y>.

WANG, Y.; ZHU, F.; HAN, F.; WANG, H. Purification and characterization of antioxidative peptides from salmon protamine hydrolysate. **Journal of Food Biochemistry**, [s. l.], vol. 32, n° 5, p. 654–671, out. 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2008.00190.x>.

WHITEHEAD, T. P.; THORPE, G. H. G.; MAXWELL, S. R. J. Enhanced chemiluminescent assay for antioxidant capacity in biological fluids. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], vol. 266, n° 2, p. 265–277, 1992. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2670\(92\)85052-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2670(92)85052-8).

YOU, L.; ZHAO, M.; REGENSTEIN, J. M.; REN, J. Purification and identification of antioxidative peptides from loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. **Food Research International**, [s. l.], vol. 43, n° 4, p. 1167–1173, maio 2010. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.02.009>.

ZAKARIA, S.; BAKAR, N. H. A. Extraction and characterization of gelatin from Black tilapia (*Oreochromis niloticus*) scales and bones. 2015. **International Conference on Advances in Science, Engineering, Technology & Natural Resources (ICASETNR-15)** [...]. [S. l.: s. n.], 2015. p. 77–80.

ZHANG, J.; WANG, J.; CHEN, L.; YU, X.; ZHANG, S.; YU, Y. Toxicity and toxicokinetics of a four-week repeated gavage of levamisole in male beagle dogs: a good laboratory practice study. **Pharmaceuticals**, [s. l.], vol. 17, n° 1, p. 141, 22 jan. 2024. <https://doi.org/10.3390/ph17010141>.

ZHANG, Y.; DUAN, X.; ZHUANG, Y. Purification and characterization of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin. **Peptides**, [s. l.], vol. 38, n° 1, p. 13–21, nov. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.08.014>.

APÊNDICE

Apêndice A — Resultados significativos e não significativos das estimativas dos coeficientes do modelo de regressão logística binomial (GLM) para a mortalidade de *T. molitor* em função da dose (μg), tempo (horas) e interações com as frações, utilizando a amostra controle como referência.

(Continua)

Termo ^A	Coeficiente ^B	Desv. Pad. ^C	Z ^d	P> z ^e	[0.025 ^f	0.975] ^f
Intercept	-26,5664	45829,39	-0,0006	0,9995	-89850,5	89797,39
fração[T.F1]	25,3878	45829,39	0,0006	0,9996	-89798,6	89849,35
fração[T.F2]	21,5172	45829,39	0,0005	0,9996	-89802,4	89845,48
fração[T.F3]	24,2111	45829,39	0,0005	0,9996	-89799,7	89848,17
fração[T.F4]	24,6872	45829,39	0,0005	0,9996	-89799,3	89848,65
fração[T.F5]	24,3407	45829,39	0,0005	0,9996	-89799,6	89848,3

Apêndice A — Resultados significativos e não significativos das estimativas dos coeficientes do modelo de regressão logística binomial (GLM) para a mortalidade de *T. molitor* em função da dose (μg), tempo (horas) e interações com as frações, utilizando a amostra controle como referência.

(Continuação)

Termo ^A	Coeficiente ^B	Desv. Pad. ^C	Z ^d	P> z ^e	[0.025 ^f	0.975] ^f
fração [T.F6]	25,3139	45829,39	0,0006	0,9996	-89798,6	89849,27
fração [T.F7]	23,1749	45829,39	0,0005	0,9996	-89800,8	89847,13
Q('dose (μg '))	0,0159	0,0032	5,0474	0	0,0097	0,0221
Fração[T.F1]:Q('dose (μg '))	-0,0088	0,0076	-1,1583	0,2467	-0,0237	0,0061
fração[T.F2]:Q('dose (μg '))	0,0368	0,0115	3,2104	0,0013	0,0143	0,0592
fração[T.F3]:Q('dose (μg '))	0,0026	0,0084	0,3144	0,7532	-0,0138	0,0191

Apêndice A — Resultados significativos e não significativos das estimativas dos coeficientes do modelo de regressão logística binomial (GLM) para a mortalidade de *T. molitor* em função da dose (μg), tempo (horas) e interações com as frações, utilizando a amostra controle como referência.

(Continuação)

Termo ^A	Coeficiente ^B	Desv. Pad. ^C	Z ^d	P> z ^e	[0.025 ^f	0.975] ^f
fração[T.F4]:Q('dose (μg '))	-0,0049	0,0086	-0,5656	0,5717	-0,0217	0,012
fração[T.F5]:Q('dose (μg '))	0,0031	0,0081	0,3795	0,7043	-0,0128	0,0189
fração[T.F6]:Q('dose (μg '))	-0,0158	0,0079	-1,9995	0,0456	-0,0313	-0,0003
fração[T.F7]:Q('dose (μg '))	0,0029	0,0093	0,3101	0,7565	-0,0154	0,0212
Horas	0,0165	482,373	0	1	-945,417	945,4503
fração[T.F1]:Horas	-0,0038	482,373	0	1	-945,438	945,4299

Apêndice A — Resultados significativos e não significativos das estimativas dos coeficientes do modelo de regressão logística binomial (GLM) para a mortalidade de *T. molitor* em função da dose (μg), tempo (horas) e interações com as frações, utilizando a amostra controle como referência.

(Continuação)

Termo ^A	Coeficiente ^B	Desv. Pad. ^C	Z ^d	P> z ^e	[0.025 ^f	0.975] ^f
fração[T.F2]:Horas	0,0117	482,373	0	1	-945,422	945,4454
fração[T.F3]:Horas	-0,0001	482,373	0	1	-945,434	945,4336
fração[T.F4]:Horas	-0,0039	482,373	0	1	-945,438	945,4298
fração[T.F5]:Horas	0,0073	482,373	0	1	-945,426	945,4411
fração[T.F6]:Horas	-0,0006	482,373	0	1	-945,434	945,4332
fração[T.F7]:Horas	0,0135	482,373	0	1	-945,42	945,4472

Apêndice A — Resultados significativos e não significativos das estimativas dos coeficientes do modelo de regressão logística binomial (GLM) para a mortalidade de *T. molitor* em função da dose (μg), tempo (horas) e interações com as frações, utilizando a amostra controle como referência.

(Continuação)

Termo ^A	Coeficiente ^B	Desv. Pad. ^C	Z ^d	P> z ^e	[0.025 ^f	0.975] ^f
Q('dose (μg ')):Horas	0	0	1,0913	0,2752	0	0,0001
fração[T.F1]:Q('dose (μg ')):Horas	-0,0001	0,0001	-0,6775	0,4981	-0,0003	0,0001
fração[T.F2]:Q('dose (μg ')):Horas	-0,0002	0,0001	-1,6857	0,0919	-0,0005	0
fração[T.F3]:Q('dose (μg ')):Horas	0,0001	0,0001	0,5986	0,5494	-0,0001	0,0003
fração[T.F4]:Q('dose (μg ')):Horas	0,0003	0,0001	2,4731	0,0134	0,0001	0,0006
fração[T.F5]:Q('dose (μg ')):Horas	-0,0001	0,0001	-0,8621	0,3886	-0,0003	0,0001

Apêndice A— Resultados significativos e não significativos das estimativas dos coeficientes do modelo de regressão logística binomial (GLM) para a mortalidade de *T. molitor* em função da dose (μg), tempo (horas) e interações com as frações, utilizando a amostra controle como referência.

(Conclusão)

Termo ^A	Coeficiente ^B	Desv. Pad. ^C	Z ^d	P> z ^e	[0.025 ^f	0.975] ^f
fração[T.F6]:Q('dose (μg ')):Horas	0,0001	0,0001	0,8814	0,3781	-0,0001	0,0003
fração[T.F7]:Q('dose (μg ')):Horas	-0,0001	0,0001	-0,4865	0,6266	-0,0003	0,0002

Fonte: Dados da pesquisa.

^a Nome da variável incluída no modelo.

^b Valor estimado do log-odds associado ao termo. Indica a direção e a intensidade do efeito sobre a probabilidade de mortalidade.

^c Desvio padrão.

^d Estatística Z. Coeficiente dividido pelo desvio padrão.

^e A probabilidade de observar um valor da estatística z tão extremo quanto o obtido se a hipótese nula (coeficiente = 0) for verdadeira.

^f Intervalo de confiança de 95 % para o coeficiente.