

## PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DE BLACK SOLDIER FLY (*Hermetia illucens*) E O EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO PROBIÓTICA NA DIETA LARVAL

FLÁVIA ROCHA MEDEIROS<sup>1</sup>; RAFAEL RODRIGUES RODRIGUES<sup>2</sup>;  
CLEIDEANNY CANCELA GALVÃO<sup>3</sup>, MARIANA BARROS DEUNER<sup>4</sup>, NATÁLIA  
KOMMLING VILELA<sup>5</sup>, FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [rochamedeirosflavia@gmail.com](mailto:rochamedeirosflavia@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [rafaelr458@gmail.com](mailto:rafaelr458@gmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [annymedvet@gmail.com](mailto:annymedvet@gmail.com)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – [marianabarros135@gmail.com](mailto:marianabarros135@gmail.com)

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – [nataliakvilela@gmail.com](mailto:nataliakvilela@gmail.com)

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – [fabricio.rochedo@ufpel.edu.br](mailto:fabricio.rochedo@ufpel.edu.br)

### 1. INTRODUÇÃO

O uso de antibióticos e promotores de crescimento na avicultura de corte, embora comum para melhorar o desempenho zootécnico e prevenir enfermidades, contribui para o surgimento de bactérias multirresistentes, representando riscos à saúde pública e desafios econômicos (MEHDI et al., 2018). Restrições e proibições internacionais quanto ao uso desses compostos reforçam a necessidade de alternativas sustentáveis na produção avícola (SANTOS et al., 2025).

Nesse cenário, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) destacam-se como candidatos promissores devido à sua ação rápida e ampla contra patógenos, baixo potencial indução de resistência e origem natural (JENSSEN, 2006; SANTOS et al., 2025). Dentre as fontes não convencionais, a mosca *Hermetia illucens*, conhecida como *Black Soldier Fly* ou mosca Soldado Negro, destaca-se por produzir PAMs eficazes contra patógenos aviários (PARK et al., 2017). A incorporação de PAMs derivados dessa espécie na dieta de frangos de corte pode reduzir a dependência de antibióticos, atendendo às demandas atuais por sustentabilidade e segurança alimentar.

Paralelamente, a farinha de *H. illucens* consolida-se como ingrediente funcional na avicultura, combinando valor nutricional superior com potenciais benefícios à saúde intestinal das aves (MOHAN et al., 2022).

Além do potencial intrínseco de *H. illucens*, estratégias nutricionais têm sido investigadas para potencializar a produção de PAMs, incluindo a modulação da dieta larval (GONZÁLEZ-ACOSTA et al., 2022; MEHDI et al., 2018). A suplementação de uma dieta com microrganismos específicos, como as leveduras *Komagataella phaffii* KM e *Saccharomyces boulardii*, além da bactéria *Bacillus toyonensis*, tem demonstrado capacidade de estimular a síntese de moléculas de defesa em outros organismos (COPPOLA, 2004; GONZÁLEZ-ACOSTA et al., 2022).

Dessa forma, este trabalho investiga o efeito de um protocolo de suplementação probiótica na dieta larval sobre a expressão de PAMs.

### 2. METODOLOGIA

#### 2.1 Microrganismos

Uma semente de *B. toyonensis* foi ativada e inoculada em Erlenmeyer com 50 mL de meio *Brain Heart Infusion* (BHI), incubada em agitador orbital a 37°C e 150 rpm por 24 h. Para obtenção dos esporos, o pré-inóculo foi adicionado a 450 mL de meio NYSM (ROOS, 2018) e incubado sob as mesmas condições por aproximadamente 96 h. Os esporos foram purificados para eliminar as células vegetativas e armazenados a -20 °C até o uso. A pureza dos cultivos foi verificada por colorações de Gram e verde malaquita.

As leveduras *K. phaffii* KM e *S. boulardii* foram cultivadas individualmente em 50 mL de meio *Yeast Extract Peptone Dextrose* (YPD) a 28°C e 150 rpm por 24 h, com monitoramento da turbidez e verificação de contaminação por coloração de Gram. No dia seguinte, os cultivos foram transferidos para 450 mL de YPD e incubados por mais 48 h. As células foram colhidas por centrifugação (1200 g, 5 min, 4 °C), lavadas com PBS e suspensas em solução salina estéril (0,9% NaCl). A quantificação celular foi realizada por contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) a partir de diluições seriadas decimais ( $10^{-6}$  a  $10^{-8}$ ) e plaqueamento em ágar YPD, com incubação a 28 °C por 48 h.

## 2.2 Crescimento e desenvolvimento das larvas

O experimento seguiu um delineamento composto por cinco grupos, cada um com quatro repetições independentes ( $n=4$ ), totalizando 20 unidades experimentais. Durante dez dias, as larvas de *H. illucens* foram alimentadas com uma dieta suplementada por meio da incorporação direta de microrganismos, na concentração de  $1 \times 10^9$  UFC por quilograma de dieta (UFC/kg). O grupo G1 recebeu uma combinação dos três microrganismos (*K. phaffii*, *S. boulardii* e *B. toyonensis*), enquanto os grupos G2, G3 e G4 receberam, respectivamente, apenas um deles: *S. boulardii*, *K. phaffii* ou *B. toyonensis*. O grupo G5, utilizado como controle, recebeu a mesma dieta, porém sem adição de probióticos.

## 2.3 Coleta do tecido e extração

Para a análise da expressão gênica de peptídeos antimicrobianos (PAMs), amostras de tecido foram coletadas ao final do período experimental. O corpo gorduroso foi selecionado como tecido-alvo por ser um sítio primário de síntese e armazenamento de moléculas de defesa em insetos, incluindo diversos PAMs (ARRESE et al., 2010). Antes da dissecação, as larvas foram higienizadas superficialmente com etanol 70% para minimizar a contaminação. O corpo gorduroso foi então dissecado sob condições assépticas, e homogeneizado e imediatamente preservado em TRIzol® Reagent (Invitrogen), a fim de estabilizar o RNA e prevenir sua degradação. A extração total de RNA foi realizada a partir do material conservado em TRIzol®, utilizando o kit PureLink® RNA Mini Kit (Invitrogen), conforme as instruções do fabricante. A qualidade e a integridade do RNA extraído foram verificadas por eletroforese em gel de agarose.

## 2.4 Síntese de cDNA e qPCR

Após a extração, 0,5 µg de RNA total de cada amostra foi utilizado como molde para a síntese de cDNA de primeira fita. A transcrição reversa foi realizada utilizando o kit com oligonucleotídeo iniciador oligo (GoScript™ Reverse Transcription Mix, Oligo(dT)).

A expressão gênica relativa dos genes alvo foi quantificada por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). As reações foram conduzidas em um volume final de 10 µL, contendo 5 µL de Master mix green (GoTaq® qPCR, Promega), 0,5 µM de cada primer específico e 1 µL de cDNA diluído.

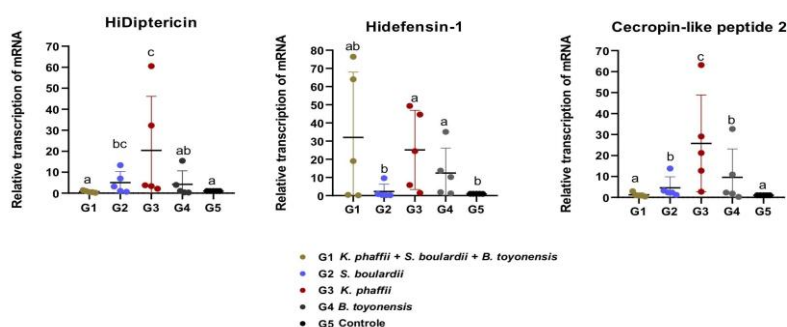
Foram avaliados genes associados à resposta imunológica inata de *H. illucens* incluindo hodefensina (*Hidef*), peptídeo do tipo cecropina 2 (*Cec-2*), hidiptericina-1 (*Dip-1*). O gene  $\beta$ -actina foi utilizado como gene de referência (*housekeeping*) para normalização dos dados. As condições de ciclagem foram: 95 °C por 1 min, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 30 s e 60 °C por 15 s, finalizando com curva de dissociação (95 °C por 1 min, 55 °C por 1 min e rampa de 55–95 °C com aquisição contínua). A especificidade dos produtos de amplificação foi confirmada pela análise do *melting curve*. A expressão gênica relativa foi calculada pelo método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Até o momento, foram avaliados os efeitos da suplementação probiótica sobre a expressão de genes de peptídeos antimicrobianos (PAMs) em larvas de *H. illucens*. Os resultados demonstraram que *K. phaffii* (G3) promoveu a maior indução de *Dip-1* e *Cec-2*, indicando forte estímulo à resposta imune inata. A expressão de *Hidef* foi mais elevada no grupo com a combinação probiótica (G1) e em G3, sugerindo efeito sinérgico e específico desses microrganismos na ativação do sistema imune. Em contrapartida, *S. boulardii* (G2) apresentou baixa indução, próxima ao controle, enquanto *B. toyonensis* (G4) mostrou resposta intermediária. Esses resultados parciais evidenciam que diferentes probióticos modulam de forma distinta a imunidade inata das larvas, sendo *K. phaffii* o mais eficiente na indução de PAMs até o momento.

Além disso, o método empregado apresenta a vantagem de ser facilmente escalonável, uma vez que permite estimular a produção de PAMs em grupos de larvas, diferentemente de outros trabalhos em que os insetos são manipulados individualmente. Isso representa um diferencial importante em termos de aplicabilidade prática (MEHDI et al., 2018). Outro aspecto relevante é a sustentabilidade do modelo (economia circular), já que *H. illucens* pode ser cultivada em resíduos orgânicos, agregando valor a subprodutos e reduzindo impactos ambientais.

Estes achados corroboram os dados da literatura, que descreve a capacidade de leveduras e bactérias probióticas em modular a resposta imune de insetos, reforçando o papel dessas interações na ativação de mecanismos antimicrobianos (ELGHANDOUR et al., 2020).



**Figura 1:** Transcrição relativa (mRNA) dos genes hidiptericina, hidiptericina-1 e peptídeo do tipo cecropina 2 em larvas de *H. illucens* submetidas aos diferentes tratamentos: G1 (*K. phaffii* + *S. boulardii* + *B. toyonensis*), G2 (*S. boulardii*), G3 (*K. phaffii*), G4 (*B. toyonensis*) e G5 (Controle). Cada ponto representa uma amostra individual de RNA dentro do grupo; valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

#### 4. CONCLUSÕES

A suplementação da dieta de *Hermetia illucens* com microrganismos demonstrou ser uma estratégia eficaz na modulação positiva da expressão gênica de peptídeos antimicrobianos (PAMs). A abordagem apresenta-se como uma alternativa promissora e não antibiótica para o controle de patógenos na avicultura, atendendo às demandas por segurança alimentar e mitigação da resistência microbiana. Como perspectivas futuras, sugere-se a avaliação detalhada da atividade antimicrobiana dos extratos larvais contra patógenos aviários de relevância econômica, visando validar seu potencial como ferramenta prática na produção de frangos de corte.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARRESE, Estela L.; SOULAGES, Jose L. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. **Annual review of entomology**, v. 55, n. 1, p. 207–225, 2010.
- COPPOLA, Mario de Menezes; GIL-TURNES, Carlos. Probióticos e resposta imune. **Ciencia rural**, v. 34, n. 4, p. 1297–1303, 2004.
- ELGHANDOUR, M. M. Y. *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* as a probiotic feed additive to non and pseudo-ruminant feeding: a review. **Journal of applied microbiology**, v. 128, n. 3, p. 658–674, 2020.
- GONZÁLEZ-ACOSTA, Sergio *et al.* Efficient oral priming of *Tenebrio molitor* larvae using heat-inactivated microorganisms. **Vaccines**, v. 10, n. 8, p. 1296, 2022.
- JENSSEN, Håvard; HAMILL, Pamela; HANCOCK, Robert E. W. Peptide antimicrobial agents. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 3, p. 491–511, 2006.
- MEHDI, Youcef *et al.* Use of antibiotics in broiler production: Global impacts and alternatives. **Animal nutrition (Zhongguo xu mu shou yi xue hui)**, v. 4, n. 2, p. 170–178, 2018.
- MOHAN, Kannan *et al.* Use of black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) larvae meal in aquafeeds for a sustainable aquaculture industry: A review of past and future needs. **Aquaculture (Amsterdam, Netherlands)**, v. 553, n. 738095, p. 738095, 2022.
- PARK, Soon-Ik; YOE, Sung Moon. A novel cecropin-like peptide from black soldier fly, *Hermetia illucens*: Isolation, structural and functional characterization: A cecropin-like peptide from *H. illucens*. **Entomological research**, v. 47, n. 2, p. 115–124, 2017.
- ROOS, T. B. *et al.* Probiotics *Bacillus toyonensis* and *Saccharomyces boulardii* improve the vaccine immune response to Bovine herpesvirus type 5 in sheep. **Research in veterinary science**, v. 117, p. 260–265, 2018.
- SANTOS, José Mateus *et al.* BACTERIÓFAGOS E PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS COMO ESTRATÉGIAS PARA COMBATER A RESISTÊNCIA BACTERIANA: TERAPIAS ALTERNATIVAS. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 11, n. 7, p. 2248–2260, 2025.