

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE SÃO PAULO

CÂMPUS AVARÉ

CURSO DE BACHARELADO EM ENGENHARIA DE BIODIVERSIDADE

JOYCE MACHADO SILVA

**FARINHA DE *GRYLLUS ASSIMILIS*: PADRONIZAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO
E APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE PROTEASES FÚNGICAS**

AVARÉ

2021

JOYCE MACHADO SILVA

**FARINHA DE *GRYLLUS ASSIMILIS*: PADRONIZAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO
E APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE PROTEASES FÚNGICAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Engenharia de Biosistemas do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo - *Campus Avaré*, como requisito parcial à obtenção do título de Engenheiro de Biosistemas.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Marcela Pavan Bagagli

AVARÉ
2021

Catálogo na fonte

Instituto Federal de São Paulo – Campus Avaré

Silva, Joyce Machado

Farinha de *Gryllus Assimilis*: Padronização, Caracterização e Aplicação na Produção de Proteases Fúngicas/
Joyce Machado Silva. – Avaré, 2021.

48 p.

Orientador: Prof.^a Dra. Marcela Pavan Bagagli

Monografia (Graduação – Bacharelado em Engenharia de Biosistemas) – Instituto Federal de Educação,
Ciência e Tecnologia de São Paulo – Campus Avaré, Avaré, 2021.

1. Grilos. 2. Alimentos. 3. Proteína. 4. Antioxidante. I. Silva, Joyce Machado. II. Bagagli, Marcela Pavan.
IV. Título.

JOYCE MACHADO SILVA

**FARINHA DE *GRYLLUS ASSIMILIS*: PADRONIZAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO
E APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE PROTEASES FÚNGICAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Engenharia de Biossistemas do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo - *Campus Avaré*, como requisito parcial à obtenção do título de Engenheiro de Biossistemas.

COMISSÃO EXAMINADORA

[Assinado eletronicamente – documento anexo]

Porf^ª. Dr^ª. Marcela Pavan Bagagli
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo (IFSP),
Câmpus Avaré.

[Assinado eletronicamente – documento anexo]

Prof. Dr. Ruann Janser Soares de Castro
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

[Assinado eletronicamente – documento anexo]

Me. Meliane Akemi Koike
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo (IFSP),
Câmpus Avaré.

Avaré, 30 de novembro de 2021.

Dedico esse trabalho à minha mãe, Aparecida, por incentivar e apoiar meus estudos e por me manter firme nos meus objetivos. Dedico também ao meu pai Gilvan e ao Renato pela preocupação, dedicação e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha mãe, Aparecida, por me dar o suporte necessário (em diversos âmbitos) durante todo o curso. Por ter me apoiado e ter sido um alicerce muito importante durante toda essa jornada (na verdade, não só essa). Serei eternamente grata mamãe, você é mais do que especial em minha vida. Não acho que tudo isso seria possível sem você. Obrigada por confiar em mim e sempre me incentivar.

Gostaria de agradecer também meu pai, Gilvan, pelo apoio que me ofereceu durante todo o curso. E eu sei que mesmo distante torcia muito por mim. Obrigada por tudo papai.

Queria agradecer também ao Renato, por ser uma pessoa muito paciente, por me ouvir, ajudar e pelos conselhos que me deu. É uma pessoa muito boa e que sempre apoiou muito meus estudos. Obrigada pela confiança e incentivo.

Os meus sinceros agradecimentos à minha orientadora Marcela, por toda a sua paciência, ensinamentos e dedicação. É simplesmente uma profissional admirável! Tanto como professora, como orientadora, de uma didática incrível. Eu realmente espero que continue sempre assim.

Agradeço a Julia e a Meliane por realizarem junto comigo as práticas em laboratório durante a realização desse projeto, pelas conversas e saídas ao “Méqui”. Todos nós precisamos desses momentos simples, porém maravilhosos. Obrigada por compartilharem comigo esses momentos.

Gostaria de deixar registrado o meu agradecimento a todas as pessoas que fizeram e fazem parte dessa jornada (a graduação). Obrigada pela confiança, paciência e por todas as atividades em grupo: Marina (obrigada também por sempre me ouvir e me aguentar. Sei que não foi fácil); Julia (mais uma vez, porque merece); Jussara e Mayara. Vocês foram simplesmente incríveis. Também quero agradecer ao Pakú por ser um companheiro incrível e por estar sempre me animando para finalmente finalizar esse trabalho. Merece ter seu “nome” aqui. Muito obrigada por tudo, meu bem!

“Quando temos razões para alterar nosso modo de agir e pensar, a partir de argumentos que sejam fundamentados, é preciso fazê-lo.”

(Souza & Cortella, 2017, p.10)

RESUMO

O consumo de insetos apresenta-se como uma alternativa para a ingestão de proteínas de elevado valor nutricional em relação à ingestão de outras proteínas animais e vegetais. No Brasil o consumo de insetos não faz parte da cultura alimentar, sendo ainda considerados como material estranho e que gera asco à maior parte da população. No entanto, muitos estudos são observados na literatura buscando a introdução desses animais em produtos alimentícios, sendo mais comuns na alimentação animal de “pets” e peixes. Este trabalho teve como objetivo estudar o preparo de farinha de grilo (*Gryllus assimilis*), sua caracterização em termos de composição centesimal e contaminação microbiana, bem como avaliar seu potencial como indutor da produção de proteases fúngicas e a ação das proteases na capacidade antioxidante da farinha de grilo parcialmente hidrolisada. A farinha seca na temperatura de 70°C apresentou melhores resultados para o objetivo do estudo, a mesma continha um valor de umidade duas vezes menor em relação à farinha seca em temperatura de 50°C pelo mesmo tempo de exposição, não apresentando contaminação por coliformes totais ou fecais. A farinha de grilo apresentou grande potencial para obtenção de protease de *Aspergillus oryzae*, sendo obtida atividade enzimática média de 112 ± 8 U/g de substrato seco, após 96 horas de fermentação, resultado significativo quando comparado com a literatura. A farinha de grilo, hidrolisada como extrato proteolítico bruto obtido, apresentou capacidade de redução do radical DPPH duas vezes maior em relação à farinha não hidrolisada.

Palavras-chave: Grilos. Alimentos. Proteína. Antioxidante.

ABSTRACT

The consumption of insects presents as an alternative for the ingestion of high nutritional value proteins in relation to the ingestion of other animal and vegetable proteins. In Brazil, the consumption of insects is not part of the food culture, being considered as foreign material that generates disgust for most of the population. However, many studies are observed in the literature seeking the introduction of these animals in food products, being more common in animal feed for "pets" and fish. This work aimed to study the preparation of cricket flour (*Gryllus Assimilis*), its characterization in terms of centesimal composition and microbial contamination, as well as to evaluate its potential as an inducer of the production of fungal proteases and the action of proteases on the antioxidant capacity of the flour partially hydrolyzed cricket. The dry flour at a temperature of 70°C showed better results for the purpose of the study, it had a moisture value twice as low as the dry flour at a temperature of 50°C for the same exposure time, with no contamination by coliforms total or faecal. Cricket flour showed great potential for obtaining protease from *Aspergillus oryzae*, with an average enzymatic activity of 112 ± 8 U/g of dry substrate obtained after 96 hours of fermentation, a significant result when compared to the literature. Cricket flour, hydrolyzed as the crude proteolytic extract obtained, presented a DPPH radical reduction capacity twice as high as compared to non-hydrolyzed flour.

Key-words: Cricket. Food. Protein. Antioxidant.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Recursos naturais necessários para a produção de 1kg de proteína bovina, suína e de grilo.

Figura 2. Exemplos de produtos voltados para alimentação humana contendo insetos.

Figura 3 - Fluxograma de atividades desenvolvidas para atingir os objetivos do projeto.

Figura 4. Tempo de secagem dos grilos pretos inteiros realizada em estufa a 50°.

Figura 5. Tempo de secagem dos grilos pretos inteiros realizada em estufa a 70°.

Figura 6. Repetição do tempo de secagem dos grilos pretos inteiros realizada em estufa a 70°.

Figura 7. Resultado da granulometria da farinha de grilo preto triturado em um processador doméstico.

Figura 8. Cinética de produção de proteases pela fermentação da farinha de grilo preto pelo fungo *A. oryzae*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados da análise centesimal em base seca (cinzas, proteínas, lipídeos e carboidratos totais por diferença) para as farinhas de grilo preto onde os insetos foram secos a 50°C e a 70°C. As letras indicam o resultado do teste de Tukey por coluna. Letras iguais indicam que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as amostras.

Tabela 2. Resultados da análise de coliformes totais e termotolerantes e salmonela para as farinhas de grilo preto com secagem dos insetos em temperatura de 50 e 70°.

Tabela 3. Proteína (%) e capacidade de redução de DPPH, expressa como trolox equivalente (μM trolox / g ou mL) e redução radical (%). As letras indicam o resultado do teste de Tukey por coluna. Letras iguais indicam que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as amostras.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

EFSA – *European Food Safety Authority*

et al. – “*et alii*” (e outros)

FAO – *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

GRAS – *Generally recognized as safe*

INCQS – *National Institute Quality Control in Health*

KOH – Hidróxido de Potásio

LST – *Lauril Sulfato Triptose*

NMP – Números Mais Prováveis

PES – Produto Bioconvertido em Estado Sólido

rpm – Rotação Por Minuto

TE – Trolox Equivalente

VB – Verde Brilhante

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Problematização	18
1.2	Objetivos	18
1.2.1	Objetivo Geral	18
1.2.2	Objetivos Específicos	18
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	Insetos na alimentação humana e animal	19
2.2	Potencial de aplicação da farinha de grilo	22
2.2.1.	Aplicações na alimentação humana	22
2.2.2.	Aplicação na alimentação animal	24
2.2.3.	Aplicação em processos fermentativos e enzimáticos	25
3	METODOLOGIA	27
3.1	Higienização e Pasteurização dos insetos	27
3.2	Padronização de temperatura e tempo de secagem dos insetos	28
3.3	Moagem e padronização da granulometria da farinha	28
3.3.1	Caracterização da farinha de grilo	28
3.3.1.1	Determinação da umidade e cinzas	29
3.3.1.2	Determinação do teor de nitrogênio total e estimativa do teor de proteínas	29

3.3.1.3	Determinação do teor de lipídios	29
3.3.1.4	Carboidratos totais	29
3.3.1.5	Análise de coliformes totais e termotolerantes	30
3.3.2	Análise de Salmonelas	30
3.4	Análise da granulometria da Farinha	30
3.5	Aplicação da farinha para produção de proteases fúngicas	30
3.5.1	Fungo filamentoso	30
3.5.2	Cultivo de <i>A. oryzae</i> em farinha de grilo	31
3.5.3	Análise da atividade de protease	31
3.6	Atividade antioxidante da farinha de grilo hidrolisada por proteases fúngicas	31
3.6.1	Hidrólise da farinha de grilo	31
3.7.	Análises estatísticas	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	33
4.1	Padronização da temperatura de secagem dos insetos	33
4.2	Análise centesimal	35
4.3	Padronização da granulometria da farinha	38
4.4	Produção de protease utilizando a farinha de grilo como substrato para fermentação	38
4.5.1	Atividade antioxidante	39
5	CONCLUSÃO	41

1 INTRODUÇÃO

Na última década, os insetos ganharam visibilidade e se tornaram tendência para alimentação humana e de outros animais, sendo considerados como uma fonte alternativa de alimento rico em nutrientes, que apresentam alto teor de proteínas e gorduras quando comparado com alimentos de origem bovina, suína e avícola (TUNES, 2020). Além disso, acredita-se que a produção dos insetos como fonte de proteína têm menos impacto ambiental quando comparados com outras fontes protéicas utilizadas atualmente para a alimentação (FAO, 2015).

Considerando a alimentação humana, algumas espécies são nocivas à saúde humana, produzindo toxinas ou causando alergias diversas, no entanto, mais de 1900 espécies de insetos são reconhecidas como comestíveis, dentre as mais comuns estão as formigas, abelhas, larvas, besouros, mosquitos e grilos. (SRIVASTAVA *et al.*, 2009; RIBEIRO, 2017). De acordo com o Comitê Científico EFSA (EFSA *Scientific Committee*, 2015), outros riscos associados ao consumo de insetos estão ligados à presença de metais pesados e pesticidas em sua composição.

Países asiáticos, africanos e alguns povos da América Latina consomem insetos costumeiramente. Contudo, para países ocidentais essa prática é pouco difundida, encontrando uma grande resistência cultural a qual rejeita esse tipo de alimento (SRIVASTAVA *et al.*, 2009; RIBEIRO, 2017; SOUZA *et al.*, 2017). Muitos dos benefícios da alimentação humana ou animal através de insetos não são amplamente divulgados para o público em geral, podendo ser uma das causas da rejeição desse produto.

Porém, para muitos países e povos, os insetos têm uma grande importância para garantir a alimentação, já que os insetos são capazes de oferecer alimento proteicos e calóricos com um baixo custo e pouca necessidade de recursos naturais (ANANKWARE *et al.*, 2014). A FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*), desde 2003 prevê dificuldades com o fornecimento de *proteínas* de forma sustentável à crescente população até 2050, e vem incentivando a propagação do consumo de insetos comestíveis desde então (FAO, 2015).

No Brasil não há legislação específica para padrão de identidade e qualidade de alimentos à base de insetos, sendo estes ainda considerados como contaminantes em alguns alimentos como a farinha de trigo (BRASIL, 2014). Os produtos existentes no mercado hoje, a partir de insetos, são produzidos de forma artesanal. Para empresas que têm interesse em produzir insetos como matéria prima no Brasil, deverão submeter estes produtos a uma série de análises, de maneira a classificá-los (TUNES, 2020).

Por possuírem enzimas em sua constituição, como celulasas e/ou proteases, os insetos servem de interesse em muitas aplicações alimentares diferentes, sendo uma alternativa para a indústria alimentícia e biotecnológica (SCHLUTER, 2016). A biotransformação de proteínas em hidrolisados proteicos, aplicando enzimas, é uma estratégia utilizada para aprimorar as funcionalidades de proteínas, tais como solubilidade e formação de espuma, além de levar a produção de peptídeos com atividades biológicas diversas, tais como antioxidantes, anti-hipertensivos, anti-trombóticos, antimicrobianos, anti-inflamatórios e anti-adipogênico (CASTRO & SATO, 2015; CASTRO *et al.*, 2018; HEYES, 2018).

Neste contexto, este projeto visa padronizar e caracterizar a farinha de grilo (*Gryllus assimilis*), de forma a viabilizar este produto como matéria-prima para ração animal e para alimentos humanos em relação à contaminação de patogênicos e à composição centesimal. Além disso, objetivou-se aplicar a farinha de grilo na produção de enzimas proteolíticas por fungos filamentosos, as quais atuarão na própria proteína do inseto, sendo avaliado o aumento da capacidade antioxidante da farinha parcialmente hidrolisada.

1.1 PROBLEMATIZAÇÃO

Com o crescente aumento populacional no mundo, surgiram preocupações de grandes organizações como a FAO, em relação ao fornecimento de proteínas que atendesse a demanda alimentar humana e animal nos próximos anos de maneira mais sustentável. A partir desse contexto, os insetos se tornaram um possível substituto para as principais fontes de proteínas que são utilizadas atualmente, como a carne de aves, bovina e suína; e a soja.

Essa escolha deve-se pelo alto valor nutritivo dos insetos, além de conter uma quantidade e qualidade de proteína significativa e sua produção ter menos impacto ambiental, sendo, assim, mais sustentável quando comparado com as atuais fontes de proteínas. O trabalho contribui com a busca e análises dessas novas fontes de proteínas, em específico a farinha de grilo preto (*Gryllus assimilis*), para a alimentação animal e humana e aplicação em processos fermentativos e enzimáticos, de forma a contribuir com o discernimento dessa nova prática.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo padronizar o processo de produção e caracterizar a farinha de grilo preto (*Gryllus assimilis*), além de estudar a produção de enzimas proteolíticas por fungos filamentosos, utilizando a farinha de grilo preto como substrato indutor da produção de enzimas, que foram aplicadas na hidrólise da própria farinha do inseto. A atividade antioxidante das farinhas parcialmente hidrolisadas também foi analisada e comparada com a farinha sem hidrólise.

1.2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do trabalho são:

- Produzir farinha de grilos preto (*Gryllus assimilis*) aplicando princípios de boas práticas de fabricação de alimentos além de processo térmico de pasteurização nos insetos;
- Padronizar a temperatura e o tempo de desidratação dos insetos;
- Avaliar a granulometria da farinha de grilo preto obtida;
- Avaliar a composição centesimal da farinha de grilo preto obtida;
- Avaliar a contaminação microbiológica (coliformes totais e salmonellas) da farinha de grilo preto;
- Avaliar a fermentação em estado sólido da farinha de grilo preto por fungo filamentosos através da quantificação de proteases;
- Hidrolisar a farinha de grilo preto utilizando extratos enzimáticos brutos obtidos;
- Quantificar a capacidade antioxidante dos hidrolisados da farinha de grilo parcialmente hidrolisados.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Insetos na alimentação humana e animal

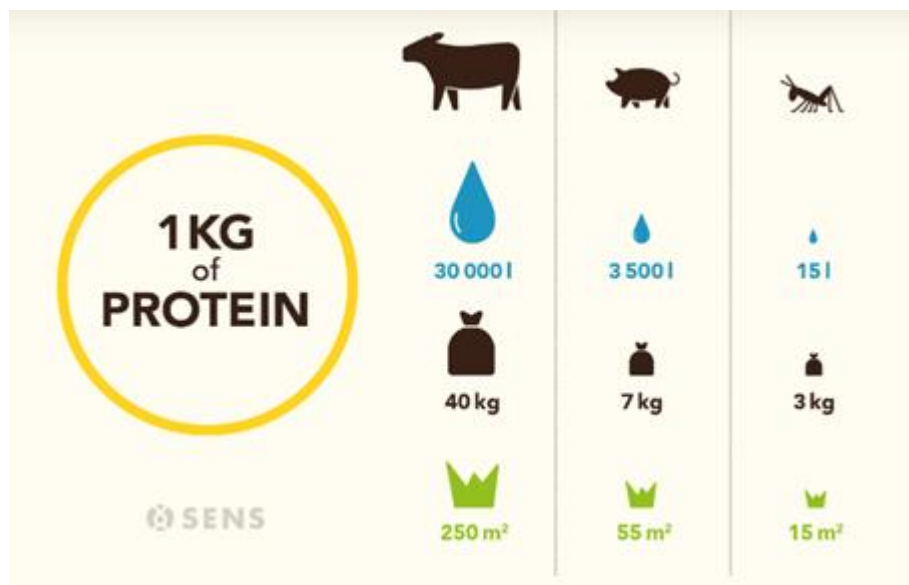
Acredita-se que os insetos fazem parte da alimentação humana desde a pré-história. Hoje, estima-se que dois bilhões de pessoas praticam a entomofagia (consumo de insetos como alimento) no mundo. Segundo a FAO, as regiões da Ásia, África e da América Latina incluem em sua dieta espécies de insetos como os besouros, lagartas, vespas, formigas, gafanhotos e grilos (TUNES, 2020; FAO, 2015). Contudo, para muitas sociedades ocidentais, o consumo de insetos não é comum, sendo uma prática alimentar que causa repúdio em grande parte da população (CHEUNG & MORAES, 2016). Segundo Verbeke (2015) a aprovação e aceitação dos insetos como uma fonte segura de proteína ainda é um desafio para muitos consumidores.

Mais de 1900 espécies de insetos no mundo são considerados como comestíveis segundo a FAO (2015). No Brasil, existem 135 espécies de insetos comestíveis

conhecidas. Os mais consumidos são os himenópteros (formigas), os coleópteros (besouros) e os ortópteros (gafanhotos e grilos). Para algumas tradições indígenas é comum o consumo de alguns desses insetos. Também são comercializados em alguns bares do nordeste brasileiro espécies de himenópteros, como as tanajuras (TUNES, 2020).

A FAO, desde 2003, vem prevendo dificuldades com o fornecimento de proteínas de forma sustentável à crescente população até o ano de 2050. Desde então trabalha para a propagação do consumo de insetos comestíveis ao redor do mundo, uma vez que estima que a produção de proteína de insetos apresenta vantagens ambientais em relação à criação de gado e outros animais que são utilizados como principal fonte de proteína à alimentação humana (FAO, 2015). Na Figura 1 é possível comparar valores gastos de água, alimento e espaço para a criação de bovinos, suínos e de insetos. Nota-se que a criação de insetos tem um valor significativamente menor quando comparado com as outras fontes de proteína.

Figura 1. Recursos naturais necessários para a produção de 1kg de proteína bovina, suína e de grilo.



Fonte: Adaptado de www.sensbar.com (fonte original da informação *Edible insects - Future prospects for food and feed security*, 2013).

Os insetos podem apresentar em sua composição elevado teor de proteínas (de 13 a 77% em base seca), lipídios, vitaminas e apresentam elevado valor calórico (KOURIMSKÁ & ADÁMKOVÁ, 2016). Segundo Romeiro *et al.* (2015), os insetos podem ter um papel importante como suplemento alimentar para crianças subnutridas, por ser uma fonte de proteína e nutrientes de alta qualidade quando comparado com carnes bovinas e carnes de peixe.

Na alimentação animal os insetos fazem parte da cadeia alimentar de muitas espécies, entre eles peixes, sapos, tartarugas, iguanas, cobras e aves. Para Oliveira *et al.* (2020), a farinha de insetos tem um grande potencial para as rações animais, por sua capacidade proteica e um perfil de aminoácido que pode ser satisfatório dependendo da espécie utilizada. Segundo o trabalho de Medrado *et al.* (2018), a farinha de alguns insetos pode ser uma fonte proteica superior, com valores entre 48% e 79% de proteína bruta, em relação ao farelo de soja, com valor de 45% de proteína bruta, sendo esse último mais utilizado na alimentação animal atualmente.

No que diz respeito à assuntos regulatórios, no Brasil não há legislação específica para padrão de identidade e qualidade de alimentos à base de insetos, sendo estes ainda considerados como contaminantes em alguns alimentos como a farinha (BRASIL, 2014). A União Europeia atualizou recentemente a sua legislação sobre produtos alimentares e, em 2021, foi autorizada a venda de larvas desidratadas de *Tenebrio molitor*, que foi classificada como um novo alimento (EFSA NDA Panel, 2021a). Ainda, em outubro de 2021, a União Europeia aprovou a comercialização de gafanhoto-migratório (*Locusta migratoria*) como um novo alimento, podendo ser comercializado congelado, seco ou em pó (EFSA NDA Panel, 2021b; Comissão Europeia, 2021).

A segurança do uso de insetos para a alimentação ainda é investigada. Castro *et al.* (2018) relatam a presença de patógenos que já foram encontrados em algumas espécies de insetos comerciais, como coliformes fecais e totais. Para Ananware (2014), pode-se evitar contaminações microbianas e químicas quando as condições nas instalações de criação de insetos, manejo e alimentação sejam controladas e de acordo com os regulamentos de segurança alimentar aplicáveis à pecuária. Já Oibiokpa *et al.*

(2018) concluíram em seu trabalho que a alimentação a partir de insetos como lagarta de mariposa, cupim, grilo e gafanhoto é segura e nutritiva (KOIKE, 2020). A FAO (2015) relata que não há casos conhecidos de transmissão de doenças ou parasitoides para humanos a partir do consumo de insetos, desde que as condições de manuseio sejam feitas seguindo as boas práticas de fabricação de alimentos, ou seja, seguindo as condições sanitárias como qualquer outro alimento. Também alega que alergias podem ocorrer, e por se tratar de um grupo de invertebrados, pessoas com alergias pré-existentes à crustáceos, devem evitar consumir esse tipo de produto.

A quitina, presente na composição dos insetos, também é um fator preocupante quando se trata da alimentação animal e humana. Com valores que podem variar entre 2 a 10% nos insetos, esse carboidrato pode atuar como um fator antinutricional, que dificulta a absorção dos nutrientes, especialmente dos aminoácidos (RIBEIRO, 2017). Contudo, esse material e seus derivados apresentam aplicação na indústria alimentícia e farmacêutica (LIMA, 2015) podendo ser removido ou extraído antes de converter os insetos em alimentos e então utilizados como insumos de alto valor agregado.

2.2 Potencial de aplicação da farinha de grilo

2.2.1. Aplicações na alimentação humana

Mesmo com a falta de informação na legislação, diversos estudos para introdução de insetos em produtos alimentícios e em rações animais têm sido conduzidos no Brasil e em todo o mundo. No Instituto Federal do Mato Grosso do Sul (Câmpus Coxin), foi avaliada a aceitação de alimentos adicionados de farinha de insetos, entre eles bolo de baunilha contendo 10% de farinha de *Gryllus assimilis*, sendo o produto bem aceito pelos degustadores não treinados (SOUZA *et al.*, 2017).

No trabalho de Melo *et al.* (2018) a farinha de grilo foi introduzida em bolachas sem glúten, substituindo 5 e 10% de farinha de grilo na farinha sem glúten. Os testes para explorar a aceitação desse conceito foi feito com 102 consumidores. Cerca de 10% dos convidados recusaram o convite por repugnância. Dos convidados que aceitaram o convite, a aceitação dos biscoitos com substituição de 5% de farinha de grilo foi maior

(95% comprariam os biscoitos) do que a substituição com 10% de farinha de grilo (78,4% pessoas comprariam o produto). Os consumidores descreveram o odor como de madeira, mofo e com sabor amargo para as bolachas com 10% de farinha de grilo.

No estudo de Soares (2018), a suplementação da proteína de insetos foi feita em pães e disponibilizada para consumidores frequentes de pão. Foi possível concluir que o produto gerou uma forte correlação com o sentimento de nojo nos degustadores. Além disso, houve uma aceitação superior de experimentação pelo sexo masculino.

A comercialização de produtos com insetos para alimentação humana, no Brasil, ainda é feita de maneira artesanal. A marca *Bugs Cook*, por exemplo, produziu de forma limitada chocolates artesanais com grilos, tenébrio molitor em fase larval e formiga (TUNES, 2020). Na Europa, algumas espécies de insetos já podem ser comercializados em mercados. Recentemente, a venda do gafanhoto migratório (*Locusta migratoria*) foi autorizado pela Comissão Europeia para ser comercializado em mercados, sejam eles congelados, secos e/ou em pó (European Commission, 2021). Nos Estados Unidos e na Alemanha também são comercializados produtos fabricados com base de insetos processados. Como exemplos, a empresa norte-americana *Chirps* produz, entre outros produtos, salgadinhos; e a empresa alemã *BugFoundation*, produz hambúrgueres para alimentação humana (TUNES, 2020). A Figura 2 ilustra alguns produtos à base de insetos, destinados à alimentação humana, produzidos industrialmente.

Figura 2. Exemplos de produtos voltados para alimentação humana contendo insetos.



Fonte: Elaborado pela autora, fotos adquiridas nos sites das empresas fabricantes.

2.2.2. Aplicação na alimentação animal

Segundo o trabalho de Silva *et al.* (2020), a produção de insetos para nutrição em ração de peixes se mostrou satisfatória no desempenho da reprodução dos aquícolas e aumento da viabilidade dos sistemas. Além disso, a ração de insetos mostrou ser uma fonte relevante para substituição da farinha de peixe que é mais utilizada atualmente. De acordo com Tubin (2017), a adição de farinha de tenebrio (*Tenebrio molitor*) na alimentação de tilápias (*Oreochromis niloticus*) é sugerida com inclusão máxima de até 15% de farinha do inseto.

No trabalho de Altmann *et al.* (2018) a substituição da fonte proteica de soja pela farinha de larvas de mosca soldado-negro (*Hermetia illucens*), na criação de frango, resulta em um produto semelhante à criação de frango com alimentação padrão,

mostrando o potencial satisfatório da farinha de inseto na substituição na dieta de frangos de corte.

Em relação a utilização de insetos na ração para *pets*, Reis e Dias (2020) evidenciaram em seus estudos que a farinha de tenébrio gigante (*Zophobas morio*) apresentou valores satisfatórios de aminoácidos essenciais para cães e gatos. Para os gatos, não houve diferença de digestibilidade quando nutrido pela farinha de tenébrio gigante (*Zophobas morio*), bem como o pH fecal não foi alterado.

2.2.3. Aplicação em processos fermentativos e enzimáticos

O grilo (*Gryllus assimilis*) possui uma alta quantidade de proteínas de qualidade, fazendo com que seja uma fonte em potencial para a produção de peptídeos bioativos utilizando proteases ou complexo multienzimáticos com atividades de protease (OIBIOKPA *et al.*, 2018; CASTRO *et al.*, 2018; KOIKE, 2020).

Os peptídeos bioativos são sequências de aminoácidos que possuem atividade biológica, com efeitos antioxidantes, anti-hipertensivos e imunomoduladores. A fermentação, hidrólise enzimática e/ou a combinação de ambos são os métodos utilizados para a obtenção dos peptídeos bioativos. Além disso, o processo de hidrólise pode resultar na redução dos fatores alergênicos, na melhora da digestibilidades e na própria produção dos peptídeos bioativos (CASTRO & SATO, 2015).

As proteases são usadas na reação de hidrólise como catalisador para a quebra das ligações peptídicas de proteínas. Normalmente são escolhidas conforme o grau de especificidade em relação ao substrato proteico, relacionando com os aminoácidos envolvidos na ligação peptídica a ser hidrolisada. A protease de *Aspergillus oryzae* tem sido bastante usada para produzir peptídeos bioativos mais estáveis e eficazes, reduzindo o tempo de reação necessário para a hidrólise (CASTRO & SATO, 2015).

Novelli (2016) realizou um estudo comparativo de diferentes linhagens fúngicas em substrato de resíduos agroindustriais para a produção de proteases. As enzimas produzida a partir do fungo *Aspergillus oryzae* apresentaram estabilidade em diferentes

valores estudados de pH, atingindo atividade enzimática máxima, para o extrato enzimático liofilizado, de 1251,60 U/g. Koike (2020), observou atividade de proteases de extratos enzimáticos brutos, com 168 h de fermentação com *Aspergillus oryzae*, em ensaios de farelo de soja e farinha de casca de banana bruta, obtendo valor igual a 103,33 U/g. A farinha de grilo (*Gryllus assimilis*) pode ser um bom substrato para cultivo de fungos filamentosos e obtenção de enzimas que podem atuar de forma específica nas proteínas do próprio grilo.

Koike (2020) também avaliou a capacidade antioxidante da farinha de grilo preto (*Gryllus assimilis*) parcialmente hidrolisada por proteases de duas linhagens de fungos, *Trichoderma koningii* e *Aspergillus oryzae*, pela redução do radical DPPH, representado em μM de TE (Trolox Equivalente). Foram observados potencial antioxidante de 89,40 μM de TE/g de farinha no extrato com composto antioxidante da farinha hidrolisada de *T. koningii*, após 3 h de hidrólise; e 99,73 μM de TE/g de farinha para o *A. oryzae*. Ambos não apresentaram diferença significativa em relação à farinha de grilo sem enzima (98,23 μM de TE/g de farinha).

Matos *et al.* (2021) avaliaram a atividade antioxidante de hidrolisados de proteína de grilo (*Gryllus assimilis*) por proteases comerciais, sendo observado valores de IC_{50} de 455 e 71 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para os radicais DPPH e ABTS, respectivamente.

Vale lembrar, que a atividade antioxidante impede a formação ou a propagação de radicais livres, que causam as reações de oxidação. Essas reações, por sua vez, podem estar ligadas a doenças como câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, entre outras. Além disso, também afetam o tempo de prateleira de produtos alimentícios, alterando sabores e cheiros que se tornam desagradáveis. Por esse motivo, alimentos que possuem atividades antioxidantes são capazes de ter uma durabilidade maior, sem grandes alterações da sua qualidade; e sua ingestão pode prevenir a oxidação proveniente dos processos biológicos (ACHKAR, *et al.* 2013)

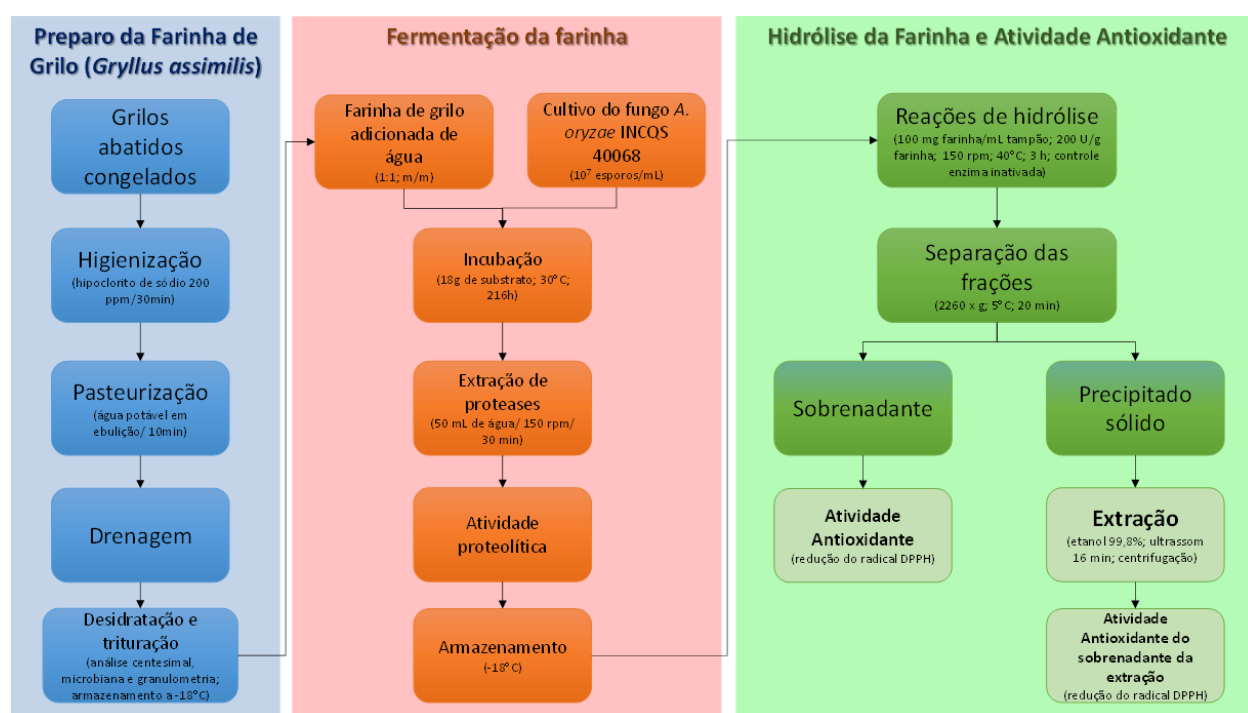
Campenhout (2021) em uma extensa revisão da literatura, afirma que processos fermentativos aplicados em insetos não estão bem estabelecidos e alerta para desvios de processo que podem ser indesejáveis, conduzindo ao cultivo de patógenos.

Entretanto, se bem conduzido, os processos fermentativos podem conduzir à melhoria do sabor, odor, vida de prateleira e digestibilidade dos insetos.

3 METODOLOGIA

A Figura 3 apresenta, de forma resumida, as atividades desenvolvidas para concluir os objetivos do projeto.

Figura 3 - Fluxograma de atividades desenvolvidas para atingir os objetivos do projeto.



Fonte: o autor.

3.1 Higienização e Pasteurização dos insetos

Para a higienização, os insetos congelados foram imersos em solução de hipoclorito de sódio 200 ppm e água potável por aproximadamente 30 minutos, sendo retirados e enxaguados após esse tempo.

No processo de pasteurização os grilos foram imersos em água potável em ebulição por 10 minutos e, em seguida, foram recolhidos com auxílio de uma peneira de inox higienizada e organizados em bandejas plásticas para desidratação. Essa etapa foi realizada seguindo as boas práticas de fabricação de alimentos.

3.2 Padronização de temperatura e tempo de secagem dos insetos

A secagem foi realizada em estufa de circulação forçada de ar, sem controle de umidade. Os grilos foram colocados em placas de vidro formando uma única camada de insetos inteiros. Estas foram colocadas na estufa e a perda de peso foi acompanhada inicialmente a cada 2 horas por 6 horas de secagem. Após esse período, a pesagem foi realizada a cada 12 horas até a obtenção de massa constante.

Duas temperaturas foram estudadas, sendo a primeira de 50°C e a outra de 70°C. Todo processo de secagem e pesagem foi realizado seguindo as boas práticas de fabricação de alimentos. Após a secagem, realizou-se a elaboração da curva de secagem nas duas temperaturas.

3.3 Moagem e padronização da granulometria da farinha

Os insetos secos foram triturados em um processador de alimentos doméstico, previamente higienizado, simulando um moinho de facas, até obter um material visualmente homogêneo. A farinha obtida foi separada em duas partes, a primeira reservada para a caracterização e a segunda para a análise de granulometria.

3.3.1 Caracterização da farinha de grilo

A composição centesimal e a contaminação microbiológica da farinha foram avaliadas de acordo com o proposto por Sousa *et al.* (2017) e nos métodos de análise de alimentos do Instituto Adolfo Lutz (2008). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.3.1.1 Determinação da umidade e cinzas

A umidade foi determinada pelo método de secagem em estufa a 105°C. Foram pesados aproximadamente 2 g de amostra de farinha de grilo em cápsulas de porcelana previamente limpas e secas. As amostras foram deixadas na estufa por 4 horas e então feita a primeira pesagem. A cada 2 horas as amostras eram pesadas até atingir peso constante. Após determinação da umidade, a amostra foi incinerada à 550°C por 6 horas e o teor de cinzas foi quantificado. A análise foi realizada em triplicata.

3.3.1.2 Determinação do teor de nitrogênio total e estimativa do teor de proteínas

O teor de nitrogênio total foi determinado pelo método de Kjeldahl. O catalisador utilizado foi composto de sulfato de cobre e sulfato de sódio. A digestão foi realizada a 360°C (utilizando uma rampa de aumento gradativo de temperatura) por 2 horas. A destilação foi realizada em aparelho micro-kjeldahl utilizando NaOH 40% e a amônia formada foi recolhida com ácido bórico 4% contendo indicador de pH misto. O material foi titulado com ácido clorídrico 0,1M padronizado até o ponto de viragem. A quantidade de nitrogênio total foi, então, calculada e a quantidade de proteína foi estimada utilizando o fator de conversão de 6,25. A análise foi realizada em triplicata.

3.3.1.3 Determinação do teor de lipídios

O teor de lipídeos foi determinado pelo método de Soxhlet utilizando como solvente éter de petróleo e a extração foi realizada por 3 horas. A massa final de lipídios foi quantificada após completa evaporação do solvente. A análise foi realizada em triplicata.

3.3.1.4 Carboidratos totais

O teor de carboidratos totais foi determinado por diferença dos demais componentes analisados, seguindo a equação 1:

$$\text{Carboidratos}_{\text{totais}} = 100\% - \%proteínas - \%lipídeos - \%cinzas - \%umidade \quad (1)$$

3.3.1.5 Análise de coliformes totais e termotolerantes

A quantificação de coliformes totais foi realizada pelo método dos números mais prováveis (NMP) utilizando o caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) em uma série de 3 tubos para 3 diluições decimais consecutivas. Esta quantificação foi confirmada com inoculação no caldo verde brilhante (VB). A quantificação dos coliformes termotolerantes foi realizada utilizando o caldo EC a 45°C, sendo inoculados apenas os tubos positivos da análise de coliformes totais. Todas as análises foram observadas após incubação de 48 horas.

3.3.2 Análise de Salmonelas

A quantificação de salmonelas foi realizada no meio *Salmonella-Shigella*, sendo o resultado observado após 24 horas de incubação a 35 °C, onde foram buscadas colônias típicas de *Salmonella sp.*

3.4 Análise da granulometria da Farinha

A análise de granulometria da farinha foi feita utilizando 100 g do material homogeneizado. O conjunto de peneiras foi montado na seguinte sequência: 2,4 mm, 1,20 mm, 600 µm, 300 µm, 212 µm, 75 µm e fundo, sendo agitadas na mesa agitadora por 40 minutos. Em seguida, as peneiras foram pesadas para quantificação da fração de farinha retida em cada abertura de tela.

3.5 Aplicação da farinha para produção de proteases fúngicas

3.5.1 Fungo filamentoso

O fungo filamentoso utilizado neste trabalho pertence ao laboratório de Bioprocessos do Departamento de Ciências Químicas e Bioquímicas do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu. A linhagem *Aspergillus oryzae* INCQS 40068 foi conservada em tubos de ensaio com *slants* de ágar batata dextrose (PDA) mantidos a 5°C e foram repicados a cada 6 meses

3.5.2 Cultivo de *A. oryzae* em farinha de grilo

A farinha de grilo foi umedecida com água destilada na proporção 1:1 (m:m), sendo adicionado 18 g da mistura em frascos Erlenmeyer de 150 mL. Os frascos foram autoclavados a 121°C por 15 minutos e, após resfriados, foram inoculados com 2 mL de solução de esporos do fungo *Aspergillus oryzae* INCQS 40068 na concentração de 10^7 esporos.mL⁻¹, sendo incubados a 30°C por 9 dias, sendo acompanhada a produção de proteases de tempos em tempos. Após o período de incubação realizou-se a extração das enzimas extracelulares produzidas utilizando 50 mL de água destilada e agitação de 150 rpm por 30 minutos. Os extratos foram separados da massa fermentada por filtração.

3.5.3 Análise da atividade de protease

A atividade de protease foi determinada utilizando como substrato da reação enzimática a azocaseína, de acordo com Charney e Tomarelli (1947), com modificações. A mistura reacional contendo 0,5 mL de azocaseína (Sigma) 0,5% (m:v), pH 5,0, e 0,5 mL de solução enzimática foi incubada por 40 minutos a 50°C. A reação foi, então, paralisada com a adição de 0,5 mL de TCA 10% (m:v) e o tubos de ensaio centrifugados a 3.420 x g por 15 min, 25°C. Uma alíquota de 1,0 mL do sobrenadante foi, então, neutralizado com 1,0 mL de KOH 5M. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorbância a 428 nm de 0,01 nas condições experimentais.

3.6 Atividade antioxidante da farinha de grilo hidrolisada por proteases fúngicas

3.6.1 Hidrólise da farinha de grilo

Foi preparada uma suspensão de farinha de grilo (100 mg/mL) em solução tampão de fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0, sendo adicionando o extrato enzimático bruto (200 U/g de farinha de grilo) produzido no item 3.5. A hidrólise ocorreu sob agitação de 150 rpm durante 3 h a 40°C (temperatura ótima da protease de *A. oryzae* INCQS 40068). As reações foram paralisadas por tratamento térmico em banho-maria em ebulição por 10

min e o volume reacional foi centrifugado a $2.260 \times g$ na temperatura de 5°C por 20 min. Tanto o sobrenadante quanto a fração sólida precipitada na centrifugação foram analisados em relação à atividade antioxidante. A hidrólise foi conduzida em triplicata bem como o controle reacional, em que a solução enzimática foi inativada por aquecimento a 100°C por 5 minutos antes de ser inserida na reação.

3.6.2 Atividade Antioxidante

Os sobrenadantes das hidrólises e dos controles foram analisados diretamente. Porém, o material sólido precipitado passou previamente por processo de extração de compostos antioxidantes. Para tanto, foram acrescentados 10 mL de etanol 99,8 % em 0,5 g de cada material sólido e esses foram submetidos a banho de ultrassom (Cristófoli 42 KHz) por 16 min. Em seguida, as misturas foram centrifugadas a $2.260 \times g$ por 10 min a 25°C . O sobrenadante destas extrações foram utilizados na análise de atividade antioxidante.

A atividade antioxidante foi avaliada pela quantificação da redução do radical sintético 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), segundo Blois (1958), com adaptações. Alíquotas de 0,5 mL das amostras foram transferidas para tubos de ensaio contendo 3,0 mL de etanol 99,8 % e 0,3 mL de solução de DPPH (Sigma-Aldrich®, St Louis, EUA) a 0,2 mg/mL em etanol 99,8 %. A mistura foi homogeneizada e mantida por 1 h no escuro à temperatura ambiente para, posteriormente, realizar a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro (UV-visível Bel Photonics UV-M51) a 517 nm. O branco foi preparado com etanol 99,8 % no lugar das amostras. Essa análise foi feita em triplicatas.

Os resultados foram expressos em Trolox Equivalente (TE) (μM de TE / g ou mL), sendo que quanto maior o valor de TE, maior a capacidade antioxidante. Para isso, foi realizada uma curva de calibração com soluções em concentrações de 0 a $100 \mu\text{M}$ de trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico, Sigma Aldrich®, St Louis, EUA).

3.7. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas através da ANOVA de um fator, com auxílio do software R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) versão 4.1.0, sendo realizadas comparação de médias pelo teste de Tukey com 95% de confiança.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Padronização da temperatura de secagem dos insetos

As Figuras 4 e 5 apresentam as curvas de secagem dos grilos, nas temperaturas de 50°C e 70°C.

Figura 4. Tempo de secagem dos grilos pretos inteiros realizada em estufa a 50°.

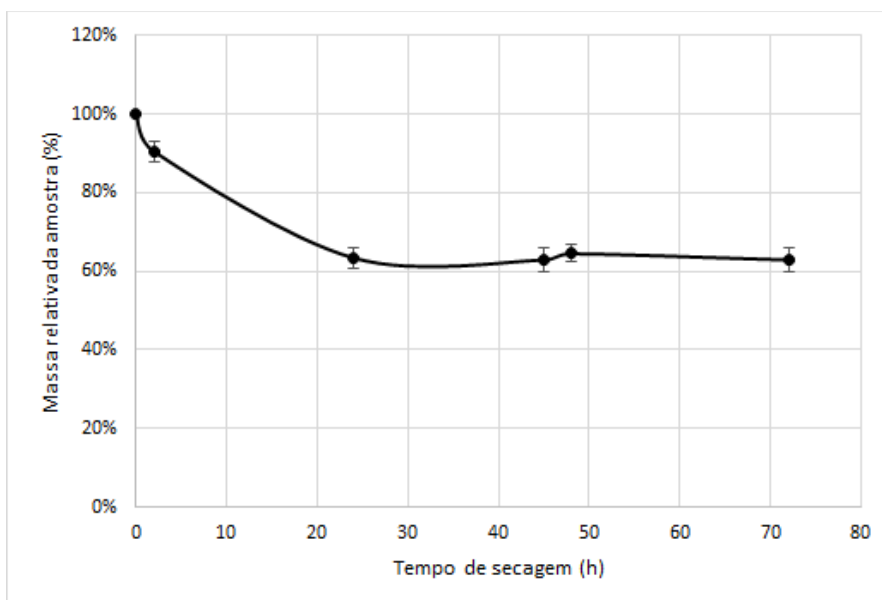
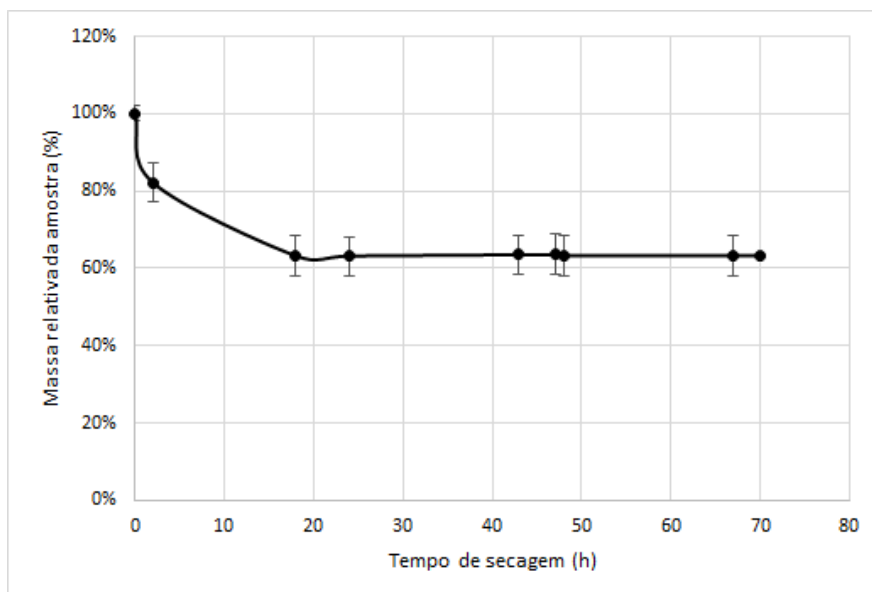
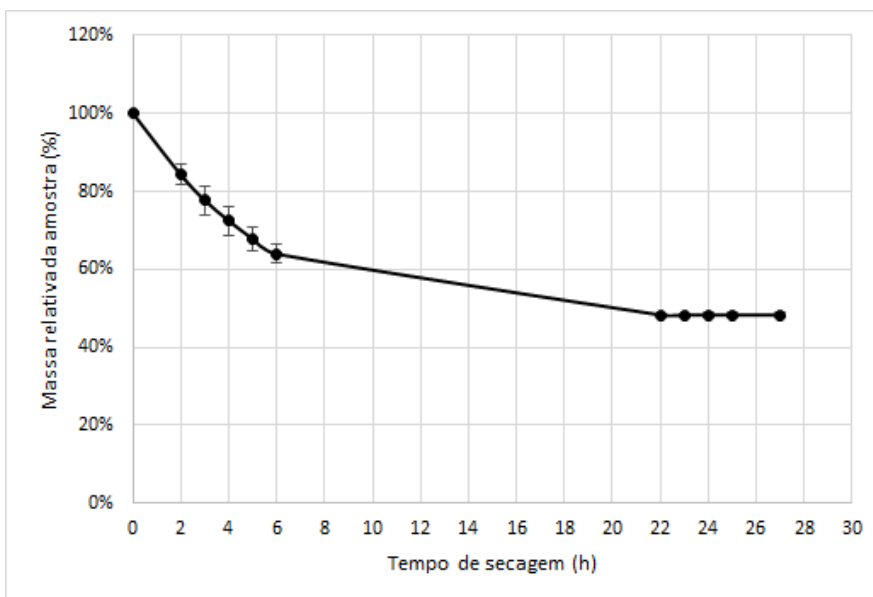


Figura 5. Tempo de secagem dos grilos pretos inteiros realizada em estufa a 70°.



As curvas de secagem para as duas temperaturas apresentaram resultados semelhantes no que diz respeito à perda de massa durante a secagem, a qual ficou em média em 37%. Em relação ao tempo de secagem, para as duas temperaturas, após 24 horas de secagem a perda de massa atingiu o valor de estabilização, no entanto, a taxa de perda de massa foi mais acentuada na temperatura de 70 °C nas primeiras 24 horas. A secagem 70°C foi repetida para validação do processo e a curva obtida está apresentada na Figura 6.

Figura 6. Repetição do tempo de secagem dos grilos pretos inteiros realizada em estufa a 70°.



No segundo processo de secagem, embora a mesma metodologia tenha sido aplicada para o preparo e secagem dos insetos, a perda de umidade foi maior, sendo que após 24h a perda de massa se estabilizou em 52%, em média. Esse fato pode ter ocorrido devido a variações na umidade relativa do ar nos diferentes dias de secagem, o que, infelizmente, não foi monitorado.

4.2 Análise centesimal

Após a secagem, os insetos foram triturados e convertidos em farinha. Neste momento, foram obtidos os resultados da determinação da umidade da farinha de grilo com a secagem dos insetos nas temperaturas de 50°C e 70°C, separadamente.

A Farinha de grilo seca na temperatura de 50°C apresentou um valor de umidade média próximo a 4,75%, sendo este valor duas vezes maior que a farinha seca na temperatura de 70°C, com 2,32%.

As Tabela 1 apresenta os resultados da análise centesimal, em base seca, das farinhas de grilo obtidas dos grilos preto, secos em cada uma das temperaturas

estudadas. Os valores estão espessos pela média das amostras e respectivos desvios-padrão, com exceção dos carboidratos totais, que está representado pelo valor médio.

Tabela 1. Resultados da análise centesimal em base seca (cinzas, proteínas, lipídeos e carboidratos totais por diferença) para as farinhas de grilo preto onde os insetos foram secos a 50°C e a 70°C. As letras indicam o resultado do teste de Tukey por coluna. Letras iguais indicam que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as amostras.

Temperatura de secagem dos insetos	Cinzas (%)	Proteínas (%)	Lipídeos (%)	Carboidratos totais (%)
50 °C	2,64 ± 0,02 ^a	63,66 ± 4,09 ^a	24,08 ± 3,67 ^a	8,41
70 °C	2,83 ± 0,89 ^a	59,80 ± 2,40 ^a	21,42 ± 11,31 ^a	15,61

O teor de carboidratos totais foi determinado por diferença em relação aos demais componentes da farinha. Em relação aos resultados obtidos, conforme esperado, em base seca, não há diferença estatisticamente significativa entre as duas farinhas de grilo obtidas no estudo, com 95% de confiança.

O teor de proteínas, estimado através da análise de nitrogênio total determinado por Kjeldahl com fator de conversão de 6,25, foi, em média, de 65,4%. Esse valor é significativo, equiparando o teor protéico da farinha de grilo a outras fontes de proteínas de origem animal, como a carne bovina (TACO, 2011). É importante salientar que o fator de 6,25 utilizado na conversão de nitrogênio total a proteína tem sido relatado como não sendo o mais adequado a ser aplicado à insetos, uma vez que parte do nitrogênio determinado advém da quitina, um polissacarídeo nitrogenado, e a quantidade de proteína acaba sendo superestimada. Janssen *et al.* (2017) avaliaram o fator de conversão para larvas de alguns insetos, sendo encontrado para o *Tenebrio molitor* o

valor médio de 4,76. Contudo esse valor ainda não é adequado para a farinha de grilo preto, por esse motivo foi mantido o a metodologia inicial do trabalho.

O teor de lipídios em base seca também foi elevado, atingindo em média 22,8%, que também é um valor próximo ao encontrado em carnes bovinas magras (TACO, 2011).

Os carboidratos totais incluem açúcares e fibras que compõem a farinha de grilo. Não foi feito o fracionamento desses carboidratos, no entanto, de acordo com a literatura, grande parte desses carboidratos é composta por quitina, polissacarídeo nitrogenado que compõem o exoesqueleto dos insetos.

A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos para a análise de coliformes totais e termotolerantes e *Salmonellas*.

Tabela 2. Resultados da análise de coliformes totais e termotolerantes e salmonela para as farinhas de grilo preto com secagem dos insetos em temperatura de 50 e 70°.

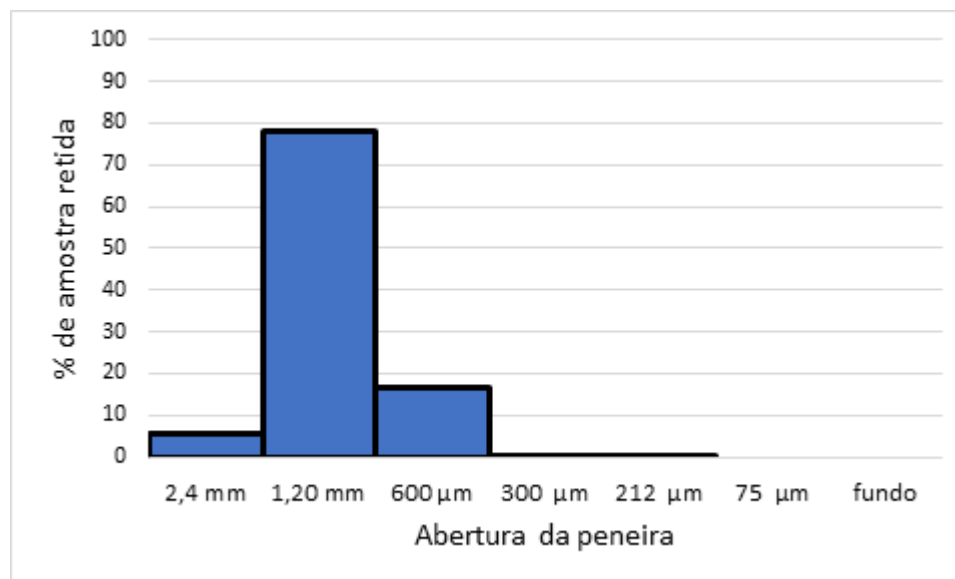
Microrganismos analisados	50° C	70° C
Coliformes (totais e termotolerantes)	Positivo	Negativo
Salmonela	Negativo	Negativo

Foi identificada a presença de coliformes termotolerantes nas amostras processadas a 50°C. As demais amostras não apresentaram nenhum teste positivo no ensaio de coliformes totais e nem colônias características de *Salmonellas* sp. Desta forma, a farinha obtida dos insetos secos a 70 °C foi utilizada nos demais estudos.

4.3 Padronização da granulometria da farinha

A Figura 7 apresenta a distribuição de tamanho de partícula da farinha de grilo, seco a 70°C, obtida após trituração em processador de alimentos doméstico.

Figura 7. Resultado da granulometria da farinha de grilo preto triturado em um processador doméstico.

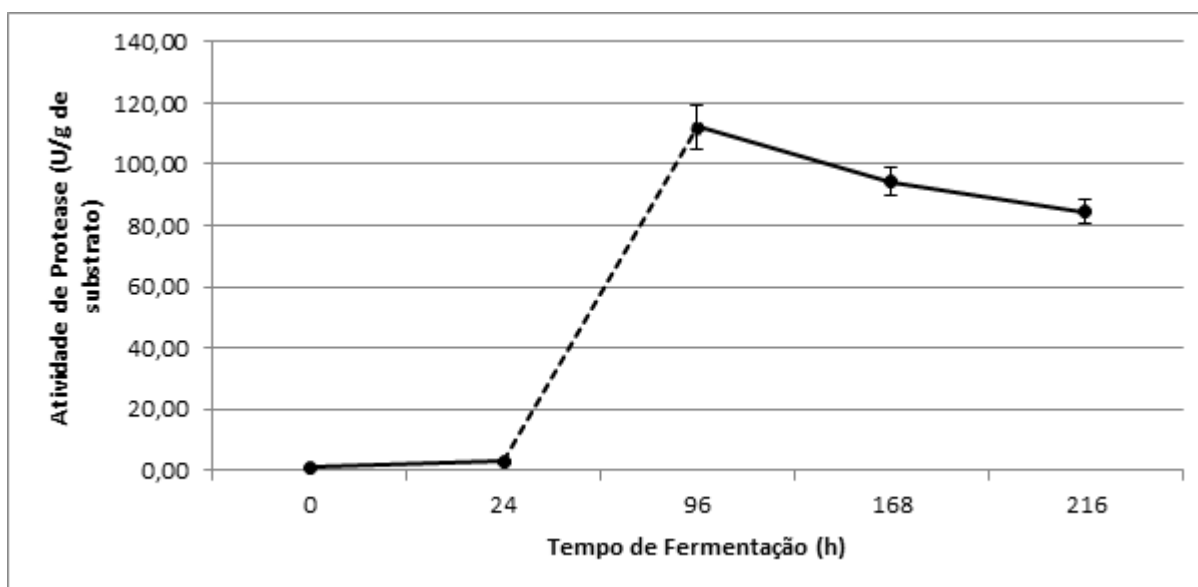


Observa-se que a maior parte da farinha apresentou tamanho de partícula acima de 1,20 mm, que é relativamente grande para apreciação do produto como farinha. Em trabalhos futuros, novos testes podem ser conduzidos utilizando um moinho de pás horizontal objetivando a redução do tamanho de partícula para aplicação como alimento.

4.4 Produção de protease utilizando a farinha de grilo como substrato para fermentação

A Figura 8 apresenta a cinética de produção de atividade de proteases pela fermentação da farinha de grilo pelo fungo filamentoso *Aspergillus oryzae* INCQS 40068. O crescimento visual do micro-organismo no início da fermentação (até 72 horas) não foi significativo. A quitina presente na composição da farinha de grilo preto pode ter influenciado no baixo crescimento do micro-organismo nas primeiras horas. Portanto as extrações nos tempos de 48 e 72 horas não foram realizadas.

Figura 8. Cinética de produção de proteases pela fermentação da farinha de grilo preto pelo fungo *A. oryzae*.



A atividade de protease obtida após 96 horas de fermentação foi elevada, sendo a farinha de grilo (*Gryllus assimilis*) considerada um bom substrato para o cultivo de *A. oryzae* INCQS 40068. A produção de proteases atingiu atividades semelhantes em relação a substratos convencionais, como farelo de trigo fermentado pelo mesmo microrganismo nas mesmas condições de processo (NOVELLI *et al.*, 2016; KOIKE, 2020). Considerando que as fermentações foram conduzidas em condições mínimas, sem adição de minerais, vitaminas ou outros nutrientes para suplementar a farinha de grilo preto (*Gryllus assimilis*), o resultado apresentado é promissor para a produção de proteases. Essas podem ser utilizadas para a hidrólise, de forma mais específica, da própria farinha de grilo preto, ou, ainda, pode-se utilizar o material fermentado como um produto bioconvertido em estado sólido (PES) com possíveis propriedades interessantes para a introdução na alimentação animal ou humana, como a atividade antioxidante elevada.

4.5.1 Atividade antioxidante

Foi utilizado o extrato enzimático com máxima atividade de protease observada (sendo este obtido após 96h de fermentação) nos ensaios de hidrólise da farinha de grilo.

O material sólido, resultado do processo de hidrólise após 3h de incubação, apresentou atividade antioxidante significativamente maior ($p < 0,05$) do que o controle (sem atividade enzimática). Já os sobrenadantes do processo de hidrólise e do controle, apresentaram alta capacidade de redução do radical DPPH ($>80\%$), mas não houve diferença significativa entre eles, conforme ilustrado na Tabela 3.

Tabela 3. Proteína (%) e capacidade de redução de DPPH, expressa como trolox equivalente (μM trolox / g ou mL) e redução radical (%). As letras indicam o resultado do teste de Tukey por coluna. Letras iguais indicam que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as amostras.

Ensaio	Proteína	μM trolox/g ou mL	% de Redução do radical DPPH
Controle (farinha de grilo sem atividade enzimática)	$49,2 \pm 0,3^a$	$47,0 \pm 1,4^c$	$15,8 \pm 1,8^c$
Farinha de grilo com atividade enzimática	$40,8 \pm 3,3^b$	$64,5 \pm 3,7^b$	$38,62 \pm 4,8^b$
Controle sobrenadante (farinha de grilo sem atividade enzimática)	$1,4 \pm 0,1^c$	$99,3 \pm 1,1^a$	$84,0 \pm 1,4^a$
Sobrenadante de farinha de grilo com atividade enzimática	$2,1 \pm 0,1^c$	$99,8 \pm 0,4^a$	$84,7 \pm 0,5^a$

Portanto, a farinha de grilo hidrolisada apresentou maior capacidade de redução do radical DPPH do que a farinha de grilo não hidrolisada. Embora a análise de DPPH seja apenas uma das formas de avaliação hoje aceitas para a atividade antioxidante de alimentos, os resultados obtidos apresentam relevância para obtenção de novos ingredientes para as indústrias de alimentos e rações. Além disso, a farinha de grilo fermentada pelo *A. oryzae*, um microrganismo GRAS (geralmente reconhecido como seguro) pode ser avaliada como um produto fermentado com alta capacidade antioxidante, sendo que, por não necessitar do processo sequencial de produção da

enzima e depois da hidrólise, reduz o número de etapas do processo de transformação da farinha

Estudos sobre a hidrólise de proteínas de insetos ou digestão da proteína de insetos têm sido realizados a fim de verificar a atividade antioxidante dos hidrolisados. Zielinska *et al.* (2016) avaliaram a atividade antioxidante de peptídeos obtidos de insetos submetidos a uma simulação de digestão *in vitro*; eles observaram IC₅₀ de 19,1 µg/mL de redução do radical DPPH para *Amphiacusta annulipes*. Matos *et al.* (2021) avaliaram a atividade antioxidante de hidrolisados protéicos de grilos (*Gryllus assimilis*) por proteases comerciais, obtendo valores de IC₅₀ de 455 e 71 µg/mL para os radicais DPPH e ABTS, respectivamente.

5 CONCLUSÃO

O trabalho realizado apontou a possibilidade de obtenção de farinha de grilo preto (*Gryllus assimilis*) em condições de higiene satisfatórias, aplicando boas práticas de fabricação aliada ao tratamento térmico (pasteurização) dos animais abatidos. A farinha seca em estufa a 70°C apresentou, conforme esperado, elevado teor de proteínas e lipídeos, estando os valores obtidos, em base seca, similares aos apontados pela literatura. Desta forma, o processo estudado (higienização, pasteurização, secagem e moagem) preservou a composição centesimal do produto.

A farinha de grilo umidificada foi utilizada como substrato pelo fungo filamentoso *Aspergillus oryzae* INCQS 40068, sendo que a produção de protease ao longo da fermentação foi significativa, atingindo valores similares quando o mesmo microrganismo foi inoculado em fontes mais tradicionais para a fermentação em estado sólido, como o farelo de trigo.

A farinha de grilo hidrolizada com proteases de *Aspergillus oryzae* INCQS 40068 apresentou maior atividade antioxidante em relação à não hidrolisada. Portanto, este material consiste em um produto transformado com capacidade antioxidante aumentada, o que pode ser benéfico para a aplicação em rações ou mesmo na alimentação humana,

contribuindo para a durabilidade e qualidade desses alimentos e podendo prevenir fatores endógenos ao organismo.

Trabalhos futuros podem explorar a elaboração de PES a base de farinha de grilo fermentada, bem como aprimoramentos no processo de hidrólise para se elevar a atividade antioxidante dos materiais hidrolisados (sólido e sobrenadante).

REFERÊNCIAS

ACHKAR, M. T.; NOVAES, G. M.; SILVA, M. J. D.; VILEGAS, W. **Propriedade antioxidante de compostos fenólicos**: Importância na dieta e na conservação de alimentos. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Litoral Paulista, 2013. Disponível em: http://periodicos.unincor.br/index.php/revistaunincor/article/view/1151/pdf_72. Acesso em: 15 jan. 2022.

ALTMANN, B.; NEUMANN, C.; VELTEN, S.; LIEBERT, F.; MÖRLEIN, D. Meat quality derived from high inclusion of a micro-alga or insect meal as an alternative protein source in poultry diets: a pilot study. **Foods**, v. 7 n. 3 p. 34, 2018.

ANANKWARE, P. J.; FENING, K. O.; OSEKRE, E.; OBENG-OFORI, D. Insects as food and feed: A review. **International Journal of Agricultural Research an Review**, v. 3 n. 1 p. 143-151, 2014.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181 n. 4617 p.1199-1200, 1958.

BRASIL, **Resolução da diretoria colegiada** – RDC N 14, de 28 de Março de 2014. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2014.

CAMPENHOUT, L. V. Fermentation technology applied in the insect value chain: making a win-win between microbes and insects. **Journal of Insects as Food and Feed**, v. 7 n. 4 p. 377-381, 2021.

CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. **Food Research International**, v. 74 p. 185-198, 2015.

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

CHARNEY J.; TOMARELLI R. M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **Journal Biological Chemistry**, v. 170 p. 501-505, 1947.

CHEUNG, T. L.; MORAES, M. S. **Inovação no setor de alimentos: insetos para consumo humano**. Interações, Campo Grande, v. 17 n. 3, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/inter/v17n3/1518-7012-inter-17-03-0503.pdf>. Acesso em: 21 out. 2021.

EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens)a. Scientific Opinion on the safety of dried yellowmealworm (*Tenebrio molitor* larva) as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. **EFSA Journal**, v. 19 n. 1 p. 6343-6372, 2021.

EFSA SCIENTIFIC COMMITTEE. **Risk profile related to production and consumption of insects as food and feed**. Scientific Opinion, EFSA Journal, 2015.

EUROPEAN COMMISSION. **Approval of second insect as a Novel Food**. An official EU website. Disponível em: https://ec.europa.eu/food/safety/novel-food/authorisations/approval-second-insect-novel-food_en. Acesso em: 30 out. 2021.

FAO. **A contribuição dos insetos para a segurança alimentar, subsistência e meio ambiente**. 2015. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/018/i3264e/i3264e00.pdf>. Acesso em: 18 jul. 2021.

HEYES, M. Food proteins and bioactive peptides: New and Novel sources, characterisation strategies and applications. **Foods**, v. 7 n. 38, 2018.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. In: ZENEON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. (coordenadores). **Métodos físicos-químicos para análise de alimentos**. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz, v. 4 p. 1020, 2008.

JANSSEN, R. H.; VINCKEN, J. P.; VAN DEN BROEK, L. A. M.; FOGLIANO, V.; LAKEMON, C. M. M. Nitrogen-to-protein conversion factors for three edible insects:

Tenebrio molitor, *Alphitobius diaperinus*, and *Hermetia illucens*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 65 n. 11 p. 2275-2278, 2017.

KOIKE, M. A.(2020). **Proteases Fúngicas**: Produção Utilizando Farelo de Soja e Farinha de Banana, Caracterização Enzimática e Aplicação em Farinha de Grilo. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Botucatu, 2020. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/192524>. Acesso em: 01 nov. 2021.

KOURIMSKÁ, L., ADÁMKOVÁ, A. Nutritional and sensory quality of edible insects. **NFS Journal**, v. 4, p. 22-26, 2016.

LIMA, C. F.(2015). **Potenciais aplicações da quitosana nas áreas de biotecnologia, agroindústria e farmacêutica**. Monografia – Conclusão de Curso de Graduação em Engenharia Química, USP, Lorena, 2015.

MATOS, F. M.; NOVELLI, P. K.; CASTRO, R. J. S. Enzymatic hydrolysis of black cricket (*Gryllus assimilis*) proteins positively affects their antioxidant properties. **Journal of Food Science**, v. 86 n. 2 p. 571-578, 2021.

MEDRADO, M. L. R.; ASSIS, A. D.; OLIVEIRA, G. DE; SANTOS, R. R. dos; CHAGAS, G. M.; LEANDRO, N. S. M. **Composição Química de Farinhas de Diferentes Espécies de Insetos com Ingredientes para Ração Animal**. Anais do 28o Congresso Brasileiro de Zootecnia, 2018. Disponível em: <http://www.adaltech.com.br/anais/zootecnia2018/resumos/trab-0982.pdf>. Acesso em: 06 out. 2021.

MELO, F.; CARVALHO H.; DIAS, L.; CIRÍACO, M.; FARIS, S.; PATARATA, L. Bolachas sem Glúten Enriquecidas com Farinha de Grilo: Características sensoriais com base em teste check-all-that-apply (Cata). Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD). **International Meeting on I&D in the Food Sector**, Abstract Book, v. 1 p. 245-247, 2018. Disponível em: https://www.esav.ipv.pt/ids/file/LIVRO%20de%20RESUMOS_IDFS%202018.pdf#page=257. Acesso em: 05 out. 2021.

NOVELLI, P. K.; BARROS, M. M.; FLEURI, L. F. **Novel inexpensive fungi proteases**: Production by solid state fermentation and characterization Food Chemistry, v. 198 p. 119-124, 2016.

OIBIOKPA, F. I.; AKANYA, H. O.; JIGAM, A. A.; SAIDU, A. N.; EGWIM, E. C. Protein Quality of Four Indigenous Edible Insect Species in Nigeria. **Food Science and Human Wellness**, v. 7 n. 2 p. 175-183, 2018.

OLIVEIRA C. W. DE; REIS, L. T.; MENDONÇA, L. V. P; FILHO, M. L. Farinhas de insetos na avicultura industrial. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 1, p. 722 – 728, 2020.

REIS, T. L.; DIAS A. C. C. Farinha de insetos na alimentação de não ruminantes, uma alternativa alimentar. **Veterinária e Zootecnia**, v.27, p. 001 – 017, 2020.

RIBEIRO, J. C. R. **Estudo do potencial dos insetos comestíveis para aplicação na indústria alimentar**. Dissertação de mestrado. Universidade do Porto, 2017.

ROMEIRO, T. R.; OLIVEIRA, I. D. de; CARVALHO, E. F. Insetos como alternativa alimentar: artigo de revisão. Universidade Federal de Pernambuco. **Revista de Comportamento, Cultura e Sociedade**, v. 4 p. 61, 2015.

TUNES, S. Insetos comestíveis: Com alto valor proteico, grilos, larvas de besouros e formigas conquistam espaço como alternativa alimentar; Brasil dá os primeiros passos para disputar esse mercado. **Revista Pesquisa FAPESP**, v. 290 p. 60-67, 2020. Disponível em: <https://revistapesquisa.fapesp.br/2020/04/07/insetos-comestiveis/>. Acesso em: 05 out. 2021.

SCHLUTER, O.; RUMPOLD, B.; HOLZHAUSER, T.; ROTH, A.; VOGEL, R. F.; QUASIGROCH, W.; VOGEL, S.; HEINZ, V.; JAGER, H.; BANDOCK, N.; KULLING, S.; KNORR, D.; STEINBERG, P.; ENGEL, K. H. Safety aspects of the production of foods and food ingredients from insects. **Molecules Nutrition and Food Research**, v. 61 n. 6, 2016.

SILVA, T. D.; BRÍRGIDA, M. M. S.; FURTADO-JÚNIOR, I. Produção de insetos como fonte nutricional em ração para aquicultura. *Revista Multidisciplinar de Educação e Meio Ambiente*, v. 1, n. 1 (2020): Edição Especial: Anais do I Congresso Brasileiro de Ciências Biológicas On-line.

SOARES, A. V. C. **Determinantes da aceitação do consumo de pão suplementado com adição de proteína proveniente de farinha de insetos.** Dissertação de Mestrado em Ciências do Consumo Alimentar. Universidade Aberta, p. 104, 2018. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10400.2/8028>. Acesso em: 30 out. 2021.

SOUSA, C. E. F.; MELO, D. C. F.; SANTANA, G. O.; MINAS, R. S.; KWIATKOWSKI, A. **Inserção de insetos na alimentação humana como alternativa nutricional.** 2017. Disponível em: https://www.correiobraziliense.com.br/app/noticia/revista/2019/07/07/interna_revista_correio,768107/insetos-na-alimentacao-proteina-do-futuro.shtml

SOUZA, M. de; CORTELLA, M. S. **Vamos pensar um pouco?:** Lições ilustradas com a Turma da Mônica. São Paulo, Cortez: Mauricio de Souza Editora, 2017.

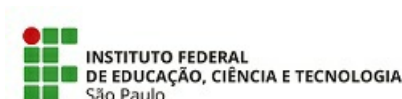
SRIVASTAVA, S. K.; BABU, N.; PANDEY, H. **Traditional insect bioprospecting: As human food and medicine.** *Indian Journal of Traditional Knowledge*, v. 8, n. 4, p. 485-494, 2009.

TACO (Tabela brasileira de composição de alimento), In: BELIK, W.; PASTORA, G. M. Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, 2011. Disponível em: https://www.cfn.org.br/wpcontent/uploads/2017/03/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf. Acesso em: 10 jul. 2021.

TUBIN, J. S. B. **Farinha de insetos na alimentação de tilápias em sistemas bioflocos e recirculação de água.** Dissertação de mestrado. Universidade do Estado de Santa Catarina, Chapecó, 2017.

VERBEKE, W. Profiling consumers who are ready to adopt insects as a meat substitute in a Western society. *Food Quality and Preference*, v. 1, n. 39, 2015.

ZIELIŃSKA, E.; KARAŚ, M.; JAKUBCZYK, A. Antioxidant activity of predigested protein obtained from a range of farmed edible insects. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 52, n. 2 p. 306-312, 2016.



FORMULÁRIO N.º 17/2021 - CBEB-AVR/DAE-AVR/DRG/AVR/IFSP

FOLHA DE APROVAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**IDENTIFICAÇÃO DO(A) ALUNO(A)****Nome:** Joyce Machado Silva**Título:** FARINHA DE *GRYLLUS ASSIMILIS*: PADRONIZAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE PROTEASES FÚNGICAS.**Curso:** Bacharelado em Engenharia de Biosistemas**BANCA EXAMINADORA****Nome:** Meliane Akemi Koike**Instituição/Departamento:** IFSP - Câmpus Avaré**Nota:** **10,0** **Julgamento:** (x) **Aprovado** () **Reprovado****Assinatura:** [assinado eletronicamente]**Nome:** Ruann Jansen Soares de Castro**Instituição/Departamento:** FEA - UNICAMP**Nota:** **8,1** **Julgamento:** (x) **Aprovado** () **Reprovado****Assinatura:****Nome:** Marcela Pavan Bagagli**Instituição/Departamento:** IFSP - Câmpus Avaré**Nota:** **9,8** **Julgamento:** (x) **Aprovado** () **Reprovado****Assinatura:** [assinado eletronicamente]**RESULTADO FINAL**

Como parte das exigências para conclusão do Curso de Engenharia de Biosistemas, o candidato(a)/aluno(a), em sessão pública, foi considerado **Aprovada** pela Comissão Examinadora, com média final **9,7**.

Avaré, 30 de novembro de 2021.

Documento assinado eletronicamente por:

- **Marcela Pavan Bagagli, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO**, em 02/12/2021 13:29:03.
- **Meliane Akemi Koike, TECNICO DE LABORATORIO AREA**, em 02/12/2021 13:55:38.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 02/12/2021. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifsp.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 265846

Código de Autenticação: 248600aa9f



FORMULÁRIO N.º 17/2021 - CBEB-AVR/DAE-AVR/DRG/AVR/IFSP

via IFSP, 2ª via do(a) Aluno(a), 3ª via do(a) Co-orientador(a)
"ras"

"Este documento não contém

Documento assinado eletronicamente por **Ruann Janser Soares de Castro, PROFESSOR DOUTOR I**, em 03/12/2021, às 14:42 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site:
sigad.unicamp.br/verifica, informando o código verificador:
CBD852D5 DF55421D A437E2EC EEC83B80

