# INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE SÃO PAULO CÂMPUS AVARÉ

# **CURSO DE BACHARELADO EM ENGENHARIA DE BIOSSISTEMAS**

**JULIA CAROLINE PORFIRIO** 

AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE QUITINA DE Tenebrio molitor

**AVARÉ** 2021

#### **JULIA CAROLINE PORFIRIO**

# AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE QUITINA DE Tenebrio molitor

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.

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

AVARÉ 2022

# Catalogação na fonte Instituto Federal de São Paulo – Campus Avaré

#### Porfirio, Julia Caroline

Avaliação do processo de extração de quitina de *Tenebrio molitor* /Julia Caroline Porfirio.— Avaré, 202 54 p.

Orientadora: prof.ª Marcela Pavan Bagagli Monografia (Graduação – Engenharia de Biossistemas) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo – Campus Avaré, Avaré, 2022.

1. Quitina. 2. *Tenebrio molitor*. 3. Biossistemas. 4. Polissacarídeo. I. Marcela Pavan Bagagli. II. Título.

#### **JULIA CAROLINE PORFIRIO**

# AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE QUITINA DE Tenebrio molitor

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 - anexo]

Dra. Marcela Pavan Bagagli

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo

[assinado eletronicamente - anexo]

Dr. Gustavo Pio Marchesi Krall Ciniciato

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo

[assinado eletronicamente - anexo]

Ma. Raissa Maria Mattos Gonçalves

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo

Avaré, 18 de fevereiro de 2022.



#### **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela minha vida e saúde para a realização deste trabalho.

Agradeço aos meus familiares pelo amparo indescritível e o incentivo ao meu amor pela ciência.

Agradeço aos meus professores pelo apoio e ensinamento, em especial, minha orientadora Marcela Pavan, sem a mesma a realização dessa pesquisa não seria possível.

Agradeço aos meus amigos por sempre estarem ao meu lado durante a realização deste trabalho.

Agradeço ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo pela estrutura fornecida durante a pesquisa.

"Faz-se ciên	cia com os fatos, com	no se faz uma casa co	m nedras: mas uma
acumulação de fatos não			
		(HENRI POI	NCARÉ, 1902, p.25)

#### RESUMO

Estima-se que cerca de 1 bilhão de toneladas de quitina são geradas anualmente na biosfera. O processo de extração da quitina é dividido tradicionalmente em três etapas, sendo elas: desproteinização, desmineralização e despigmentação; as etapas citadas apresentam como propósito a redução do teor de cinzas, teor de nitrogênio proteico e pigmentos existentes no material. O trabalho apresentou como objetivo propor uma metodologia de extração de quitina para exúvia de Tenebrio molitor e para a larva do inseto íntegro, gerando baixa quantidade de efluentes. Avaliaram-se duas sequências distintas para a extração. A sequência denominada como "1" caracterizou-se pelas etapas de despigmentação, desmineralização e desproteinização respectivamente, como diferença, a sequência 2 utilizou uma lavagem com água destilada a menos do que a sequência 1, a partir da neutralização com NaOH entre o procedimento de desmineralização e desproteinização. Ao final de cada sequência a quantidade de efluente gerado nos processos foi avaliada pela relação entre o rendimento do processo em termos de quitina bruta obtida e a quantidade de efluente gerada. Foi possível constatar que a sequência 2 apresentou valores elevados de proporção quando comparada a sequência 1 (metodologia tradicional), tanto para a exúvia de Tenebrio molitor quanto para as larvas íntegras de Tenebrio molitor, demonstrando uma menor quantidade de efluente gerado e maior quantidade de quitina bruta ao final do processo. Em questão de rendimento médio de quitina bruta obtida, a exúvia de Tenebrio molitor apresentou valores superiores quando comparada à larva íntegra do inseto, sendo que no processo da sequência 2, os valores foram, respectivamente, 32,77% e 4,36%.

Palavras-chave: Quitina; quitosana; extração; Tenebrio molitor

#### **ABSTRACT**

It is estimated that about 1 billion dropouts are produced annually in the biosphere. The chitin treatment process is implemented: in three steps, demineralization, demineralization; the aforementioned steps propose the reduction of ash content, protein ash content and existing pigments without material. The objective of this work is to propose a methodology for obtaining chitin for the exuvia of Tenebrio molitor and for the intact insect larva, generating a low amount of effluents. They evaluated distinct sequences a and two. The sequence named "1" was characterized by the steps of depigmentation, demineralization and deproteinization of water, respectively, difference, sequence 2 used a wash with less distillate from sequence 1, from the neutralization with NaOH between the procedure of demineralization and deproteinization. The amount of processes and process sequences in which tributaries were generated and the amount of generated terms were generated. It was verified as the sequence of Tenebrio molitor sequence as the sequence of sequence, demonstrating a smaller amount of generated effluent and larger amount of crude chitin at the end of the process. In terms of yield, it was totally brutal, an average exuvia of molitor presented in the sequence of insect values, and in the process of the sequence 2.32.77% and 4.36%.

**Key-words:** Chitin; chitosan; extraction; *Tenebrium molitor* 

# LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 Estrutura molecular dos polímeros (a) quitina e (b) quitosana. 19.
- Figura 2 Estrutura da quitina. 25.
- Figura 3 Diagrama morfológico de um gafanhoto para localizar a parede corporal e a matriz peritrófica contendo quitina e proteína de ligação à quitina. 27.
  - Figura 4 Desacetilação alcalina. 31.
  - Figura 5 Sequências de extração da quitina. 33.
  - Figura 6 Despigmentação e remoção de lipídios. 34.
  - Figura 7 Processo de desmineralização. 35.
- Figura 8 Demonstração do resíduo gerado pelo processo de desproteinização para a sequência de extração 1. 38.
- Figura 9 Rendimento (%) das sequências de extração de QBE das sequências 1 e 2. 39.
  - Figura 10 Proporção (%/L) de QBE das sequências 1 e 2. 39.
- Figura 11 Rendimento (%) dos processos de extração de QBI das sequências 1 e 2. 40.
  - Figura 12 Proporção (%/L) para QBI das sequências 1 e 2. 41.
- Figura 13 Teor de Cinzas (%) para QBE das sequências 1 e 2 e exúvia sem tratamento. 42.
- Figura 14 Teor de Cinzas (%) de QBI das sequências 1 e 2 e *Tenebrio molitor* sem tratamento. 43.
- Figura 15 Teor de nitrogênio total para QBE das sequências 1 e 2 e exúvia sem tratamento. 44.
- Figura 16 Teor de nitrogênio total para QBI das sequências 1 e 2 e *Tenebrio molitor* sem tratamento. 45.
- Figura 17 Açúcares redutores totais (%) para a QBI dos tratamentos 1 e 2 e exúvia sem tratamento. 46.

Figura 18 - Açúcares redutores totais (%) para a QBI dos tratamentos 1 e 2 e *Tenebrio molitor* sem tratamento. 47.

# LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fontes naturais da quitina. 18.

Tabela 2 - Quitina (% em massa) em diversos organismos. 28.

# LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASBRACI Associação Brasileira de Criadores de Insetos

EFSA Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar

EMBRAPA Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FAO Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

# SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
	1.1 PROBLEMATIZAÇÃO	20
	1.2 OBJETIVOS	20
	1.2.1 Objetivo Geral	20
	1.2.2 Objetivos Específicos	21
2	REVISÃO DA LITERATURA	21
	2.1. Insetos na alimentação humana e animal	21
	2.2. Quitina	24
	2.3. Quitina de insetos	25
	2.3. Processo de extração da quitina	28
	2.4. Quitosana e aplicações	31
3	METODOLOGIA	32
	3.1. Preparo das exúvias e dos insetos inteiros	32
	3.1.1. Insetos	32
	3.1.2. Farinha de insetos inteiros	32
	3.1.3. Preparo das exúvias	32
	3.2. Ensaios de extração de quitina	32
	3.2.1. Despigmentação e remoção de lipídios	34
	3.2.2. Desmineralização	34
	3.2.3. Desproteinização	35
	3.3. Análise da quitina	35
	3.3.1. Determinação de cinzas	36
	3.3.2. Determinação do teor de nitrogênio total	36

3.3.3. Açúcares redutores	36
3.3.4. Açúcares redutores totais	37
3.4. Análise estatística	37
4.1. Rendimento do processo e quantificação dos efluentes gerados	37
4.1.1. Extração da quitina bruta de exúvia de Tenebrio molitor	38
4.1.2. Extração da quitina bruta da larva de <i>Tenebrio molitor</i> íntegro	40
4.2. Determinação do teor de Cinzas nas quitinas brutas	41
4.2.1. Teor de cinzas na QBE	41
4.2.2. Teor de cinzas na QBI	42
4.3. Determinação do teor de nitrogênio total	43
4.3.1. Teor de nitrogênio total para a QBE	43
4.4. Quantificação de açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART)	45
4.4.1. Quantificação de AR e ART na QBE	45
4.4.2. Quantificação de AR e ART na QBI	46
5 CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS	49
ANEXO	54

# 1 INTRODUÇÃO

Em âmbito internacional, a Engenharia de Biossistemas pode ser definida como a evolução da Engenharia Agrícola centrada nas ciências biológicas que se aplica a todos os sistemas de organismos vivos. Ela combina ciência e *design* de engenharia com a ciência biológica aplicada, ambiental e agrícola, podendo ser definida como o ramo da engenharia que prepara profissionais para utilizar os conhecimentos de engenharia na solução de problemas envolvendo sistemas biológicos (AGUADO *et al.*, 2011). A engenharia de biossistemas permite um trabalho baseado em sustentabilidade, propondo, por exemplo, substitutos provenientes de fontes renováveis para plásticos convencionais utilizados em embalagens de produtos alimentícios, reduzindo assim o uso de materiais não renováveis.

A quitina é um polissacarídeo altamente biodegradável, não tóxico, insolúvel em água e em muitos solventes orgânicos (ANTONINO, 2007). Em geral, o processo de extração da quitina compreende três etapas de tratamento, sendo elas a desmineralização, a desproteinização e a despigmentação (BATTISTI & CAMPANA-FILHO, 2008).

A quitina é o principal componente dos exoesqueletos duros de aproximadamente 1 milhão de espécies de artrópodes, entre eles - insetos, lagostas e caranguejos (LEHNINGER; NELSON & COX, 2019). A tabela 1 apresenta as fontes naturais da quitina.

Tabela 1 - Fontes naturais de quitina.

Seres marinhos	Artropódes	Fontes diversas
Anelídeos	Escorpião	Algas verdes
Celenterados	Formigas	Leveduras (tipo β)
Crustáceos	Besouro	Fungos (parede celular)
Moluscos	Aranha	Algas castanhas
	Barata	Micélio de Penincillium

Fonte: Felipe et al., 2017.

A quitosana, assim como a quitina, pode ser utilizada em diversos ramos. A quitosana é originada através da reação de desacetilação da quitina em meio alcalino. O grau de desacetilação e outras características da quitosana dependem das fontes naturais de matéria-prima e dos métodos de preparação (LARANJEIRA & FÁVERE, 2009). A figura 1 representa a estrutura molecular da quitina e da quitosana.

Figura 1 - Estrutura molecular dos polímeros (a) quitina e (b) quitosana.

Fonte: Felipe et al., 2017.

Apresentando grande potencial de uso como alimento humano e animal, o *Tenebrio molitor* em sua fase larval foi recentemente aprovado pela União Europeia como primeiro inseto permitido de ser comercializado como alimento na Europa. O painel da Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA) foi convidado a

emitir um parecer sobre a larva como novo alimento nos termos do regulamento (UE) 2015/2283. Após a avaliação de sua composição e segurança, o painel concluiu que o novo alimento é seguro para o uso nos níveis propostos (EFSA Journal, 2020).

O uso de insetos como fonte de proteína está se tornando um fator importante para a alimentação humana. Após a extração de proteína para o uso alimentar, a utilização do exoesqueleto do inseto pode oferecer a possibilidade de obtenção de produtos com valor agregado, tal como a extração de quitina (SILVA *et al.*, 2017).

A extração e aplicação de quitina de artrópodes (Lucas et al., 2021; Son *et al.,* 2018) tem ganhado espaço nos trabalhos acadêmicos e constitui o tema central deste trabalho.

# 1.1 PROBLEMATIZAÇÃO

A quitina pode ser encontrada no exoesqueleto de crustáceos, na parede celular de fungos e em outros materiais biológicos. Esse biopolímero pode ser aplicado em diversos ramos da indústria (farmacêutica, alimentícia, química, etc.) e na agricultura, além da obtenção da quitosana, um polímero derivado da quitina com vasta aplicação. A extração e aplicação de quitina de inseto tem ganhado espaço nos trabalhos acadêmicos, sendo uma fonte alternativa aos crustáceos e vasta do biomaterial.

Desta forma, este trabalho busca contribuir com a ampliação da aplicação de insetos em atividades de interesse humano, através do aprimoramento do processo de extração da quitina de larvas de *Tenebrio molitor*. Além disso, o uso das exúvias deste inseto propõe um destino para o resíduo da criação massiva desses insetos.

#### 1.2 OBJETIVOS

#### 1.2.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve por objetivo avaliar a extração de quitina de *Tenebrio molitor*, para ser aplicada futuramente na obtenção de quitosana para a produção de um bioplástico, de forma a propor uma metodologia com baixa geração de efluentes.

# 1.2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do trabalho são:

- Estudo do processo de extração de quitina de larvas íntegras de *Tenebrio* molitor avaliando a relação resíduo gerado versus quantidade de quitina obtida;
- Estudo do processo de extração de quitina da exúvia de Tenebrio molitor avaliando a relação resíduo gerado versus quantidade de quitina obtida;
- Caracterização das quitinas extraídas em termos de cinzas, nitrogênio total, açúcares redutores e açúcares redutores totais.

#### 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Insetos na alimentação humana e animal

O consumo de insetos por humanos denomina-se entomofagia; a prática é realizada em muitos países ao redor do mundo, mas predominante em partes da Ásia, África e América Latina. Recentemente a entomofagia chamou a atenção da mídia, instituições de pesquisa, chefs e outros membros da indústria alimentícia, legisladores e agências que trabalham com alimentos e rações (VANTOMME & HALLORAN, 2013).

Os insetos fazem parte da cadeia alimentar de muitas espécies animais, entre eles peixes, sapos, tartarugas, iguanas, cobras e aves. Considerando a alimentação humana, mais de 2000 espécies de insetos são reconhecidas como comestíveis, sendo as mais comuns formigas, abelhas, larvas e besouros, mosquitos e grilos. Algumas espécies são nocivas à saúde humana, produzindo toxinas ou causando alergias diversas (SRIVASTAVA et al., 2009; RIBEIRO, 2017).

A FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) descreve que a fome será um dos grandes problemas que a humanidade enfrentará no futuro, portanto, se faz necessário o uso de fontes alternativas de proteínas, em substituição a uma das

mais consumidas atualmente, a carne bovina. Os insetos surgem como alternativa para lidar com este problema, visto que existem muitas espécies comestíveis já definidas e com potencial nutricional bem estabelecido (KULMANN *et al.*, 2017).

Os insetos são fontes de nutrientes e proteínas de alta qualidade quando comparados à carne bovina e ao pescado, os mesmos apresentam-se como importante suplemento alimentar para crianças que sofrem de má nutrição, pois a maioria das espécies contêm alto teor de ácidos graxos essenciais (comparáveis ao pescado). Insetos também são ricos em fibras e micronutrientes, entre eles cobre, ferro, magnésio, manganês, fósforo, selênio e zinco (VANTOMME & HALLORAN, 2013).

Os principais componentes das larvas de *Tenebrio molitor* são água, proteínas, lipídios, carboidratos, fibras, além de alguns sais minerais, como é o caso do cálcio (PINHEIRO, 2018). Portanto, quando considerada somente a matéria seca, o teor de proteínas é o mais alto, o que vem a ser benéfico na alimentação humana, já que as proteínas são um grupo de biomoléculas presentes na alimentação diária (PINHEIRO, 2018).

A ciência moderna em conjunto com os ricos conhecimentos tradicionais e culturais acerca dos hábitos alimentares pode contribuir para inovar e ampliar tecnologias que possam dar escala à criação de insetos em massa. A criação de insetos como minirrebanhos oferece uma grande oportunidade para aumentar o suprimento de insetos sem que ocorra o comprometimento de suas populações nativas (VANTOMME & HALLORAN, 2013).

Atualmente o Brasil apresenta "fazendas" dedicadas à criação de insetos e uma Associação Brasileira de Criadores de Insetos (ASBRACI) reunindo em torno de 356 associados (EMBRAPA, 2018).

Na literatura são encontrados diversos trabalhos relatando a aplicação das larvas de *Tenebrio molitor* como fonte de proteína em alimentos, tal como Costa (2017), que avaliou as proteínas de larvas de *Tenebrio molitor* para a aplicação em um

produto alimentar. As proteínas de *Tenebrio molitor* apresentaram valores de teor proteína e gordura entre 10 a 12% e propriedades funcionais semelhantes às proteínas de origem animal. Para o teor de quitina encontrado nas larvas de *Tenebrio molitor* o autor determinou um valor de 15,97 mg/kg (1,60%), semelhante ao determinado por Finke *et al.* (2007) de 19,6 mg/kg.

Estudos mostram ainda que há potencial para a inserção destes insetos em outros tipos de alimentos, como é o caso do trabalho desenvolvido por Hirata *et al.* (2021) no qual foram estudadas as propriedades físico-químicas e funcionais das farinhas de larvas de *Tenebrio molitor* (não tratada e desengordurada) para sua aplicação em produtos cárneos. Os autores determinaram um percentual proteico de 45% para a farinha não tratada, enquanto que para a farinha desengordurada esse valor foi de 60%.

A primeira pesquisa com insetos voltados para a alimentação animal conduzida pela Embrapa ocorreu no ano de 2012 no Piauí. Através da utilização de larvas de moscas domésticas como complemento alimentar de galinhas caipiras, frangos, codornas, peixes e camarões, o pesquisador Luiz Carlos Guilherme testou com sucesso esse inseto no Sistema Integrado para Produção de Alimentos (Sisteminha Embrapa). Nesse experimento, chegou-se a produzir cerca de cinco mil moscas em uma gaiola telada (EMBRAPA, 2018).

Dourado et al. (2020) avaliou a composição química e a digestibilidade da farinha de inseto para frangos de corte, a pesquisa determinou que a ração contendo larvas de *Tenebrio molitor* apresentou alto teor de nutrientes e alta digestibilidade aparente para gordura e energia, em relação a ração utilizando ninfas de *Gryllus assimilis*. Porém, Adámková et al. (2017) afirma que a ração produzida com as larvas de *Tenebrio molitor* apresenta menor digestibilidade, uma vez que o mesmo apresenta maior quantidade de quitina, material de difícil digestão, em relação às ninfas de *Gryllus assimilis*.

Tubin (2017) avaliou a adição de farinha de insetos na alimentação de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em dois sistemas de produção (bioflocos e recirculação

de água) e determinou que a inclusão de farinha de *Tenebrio molitor* na alimentação de alevinos de tilápia do Nilo gerou um aumento linear na conversão alimentar aparente. O autor sugere um limite máximo de inclusão de farinha de *Tenebrio molitor* na dieta de alevinos de tilápia de 15% em sistemas de recirculação de água devido à presença de fatores antinutricionais como a quitina.

#### 2.2. Quitina

Depois da celulose, a quitina é composto orgânico com mais abundância na natureza, trata-se de um produto natural, de baixo custo, renovável e biodegradável, de grande importância econômica e ambiental (AZEVEDO *et al.*, 2007). A quitina encontra-se na matriz da estrutura esquelética de invertebrados, como os artrópodes, anelídeos, moluscos e celenterados, em algas diatomáceas, e também está presente na parede celular de alguns fungos, como ascomicetos, zigomicetos, basidiomicetes e deuteromicetos (FILHO *et al.*, 2007).

A quitina é um homopolissacarídeo linear composto por resíduos de Nacetilglicosamina unidos por ligação glicosídica. O grau de acetilação médio da molécula interfere na quantidade de terminações amida ou amina presentes. Quando a estrutura apresenta alto grau de desacetilação, apresentando predominantemente grupamentos amina, é denominada de quitosana. Assim como na celulose, as ligações são do tipo  $\beta(1\rightarrow 4)$  (FILHO *et al.*, 2007; LEHNINGER; NELSON & COX, 2019). A única diferença da quitina em relação à celulose é a substituição de um grupo hidroxila em C-2 por um grupo amina acetilado (LEHNINGER; NELSON & COX, 2019).

A quitina forma fibras longas similares às fibras da celulose e, como a mesma, não pode ser digerida por vertebrados (LEHNINGER; NELSON & COX, 2019).

Figura 2 - Estrutura da quitina.

Fonte: Royal Society of Chemistry - ChemSpider. Disponível em: <a href="http://www.chemspider.com/">http://www.chemspider.com/</a>>.

Em função do organismo considerado, mas também do papel que desempenha, a quitina apresenta estruturas polimórficas denominadas  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -quitina. A  $\alpha$ -quitina pode ser encontrada em estruturas rígidas e resistentes, como a cutícula de artrópodes, e nesses casos ocorre fortemente associada a proteínas, materiais inorgânicos ou ambos. As formas  $\beta$ - e  $\gamma$ -quitina ocorrem em estruturas flexíveis embora também resistentes (FILHO *et al.*, 2007).

#### 2.3. Quitina de insetos

A quantidade de quitina varia dentre os organismos, os quais podem apresentar desde apenas traços, até 80% de sua fração orgânica (BEZERRA, 2015).

A quitina em insetos funciona como um material andaime, onde a morfogênese do inseto e o crescimento são estritamente dependentes da capacidade de remodelar estruturas que contêm a mesma (MERZENDORFER & ZIMOCH, 2004).

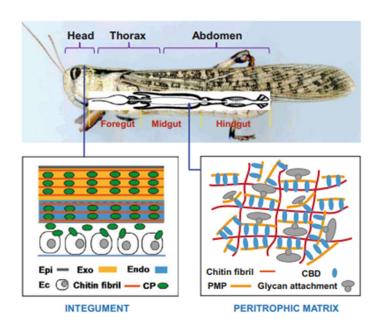
A quitina está presente em quantidade considerável nos insetos (até cerca de 20% em base seca) e isso pode ser um fator preocupante ao introduzi-los na alimentação animal, uma vez que este carboidrato pode atuar como um fator antinutricional, dificultando a absorção de nutrientes, especialmente aminoácidos (RIBEIRO, 2017; BHAVSAR *et al.*, 2021). A utilização de quitina e quitosana e a

pesquisa por novas aplicações desses materiais têm aumentado exponencialmente em diversas áreas, como na indústria de alimentos, agricultura, mas, especialmente, na indústria farmacêutica (SILVA et al., 2006).

Segundo Finke (2007), o teor de fibra existente nos insetos deve-se majoritariamente à quitina que se encontra em uma matriz com as proteínas cuticulares, lípidos e outros componentes, formando um dos constituintes da exocutícula dos insetos. Finke quantificou a quitina nas larvas de *Tenebrio molitor* em 55,7 mg/kg de inseto em peso seco.

Conforme a figura 3, a parede corporal dos artrópodes consiste principalmente em uma estrutura não celular externa (cutícula), uma camada celular média (epiderme) e uma camada membranosa não celular interna (membrana basal). O exoesqueleto formado pela epiderme trata-se de uma cobertura de corpo rígido que sustenta e protege os tecidos moles dos artrópodes. Em uma cutícula típica de artrópodes existe uma estrutura multicamada que consiste em três camadas horizontais que são funcionalmente distintas, incluindo o invólucro ceroso mais externo, a epicutícula enriquecida com proteína intermediária e a procutícula mais interna. A procutícula pode ser ainda dividida em exocutícula e endocutícula que faz interface com a epiderme. Nos artrópodes, a grande maioria da quitina está presente na procutícula como uma matriz de quitino-proteína, nas camadas do envelope ou da epicutícula a quitina é considerada ausente ou presente apenas em quantidades muito baixas (ZHAO, ZHANG & ZHU, 2019).

Figura 3 - Diagrama morfológico de um gafanhoto para localizar a parede corporal e a matriz peritrófica contendo quitina e proteína de ligação à quitina. Epi: epicutícula; Exo: exocutícula; Endo: endocutícula; Ec: célula epidérmica; CP: proteína cuticular; CBD: domínio de ligação à quitina e PMP: proteína da matriz peritrófica.



Fonte: Zhao, Zhang & Zhu (2019).

Segundo Zhao, Zhang & Zhu (2019) os principais órgãos ou tecidos internos dos artrópodes que contêm quitina incluem o trato digestivo e o sistema traqueal, onde a quitina também encontra-se na forma de matrizes de quitino-proteína. O trato digestivo consiste em um tubo epitelial que se estende da boca ao ânus. A figura 3 demonstra que o intestino do inseto é dividido em três regiões principais (intestino anterior, médio e posterior) com base nas origens embrionárias e nas funções fisiológicas. O intestino anterior e posterior originam-se do ectoderma, enquanto o intestino médio origina-se do endoderma. Tanto o intestino anterior quanto o posterior são revestidos com camada acuticular, portanto, se desprendem junto com o exoesqueleto do inseto durante a muda. Contudo, o lúmen do intestino médio é revestido por uma matriz peritrófica (PM), que é secretada pelas células intestinais. A matriz peritrófica é composta principalmente de quitina, pró-teoglicanos e proteínas ( proteínas PM ou PMPs). O conteúdo de quitina da matriz peritrófica é estimado entre 3 e 13% (p/p) variando conforme a espécie de inseto, enquanto a parte proteica (proteínas, glicoproteínas e

proteoglicanos) é responsável por 20-55% (p/p) da massa total da matriz peritrófica. A quitina presente na matriz peritrófica não só contribui para as resistências mecânicas e de tração, através do fornecimento de uma malha fibrilar, mas também é responsável pela permeabilidade da MP, associando-se fortemente às microfibrilas de quitina.

A tabela 2, adaptada de Filho *et al.* (2007), representa a quantidade média de quitina em alguns organismos, incluindo insetos.

Tabela 2- Quitina (% em massa) em diversos organismos

Tabola 2 Gartina (70 om massa) om ar	Quitina (% em massa)	
Crustáceos		
Erimacrus (caranguejo)	18,4 <sup>(d)</sup>	
Nephrops (lagosta)	69,8 <sup>(c)</sup>	
Crangon (camarão)	5,8 <sup>(d),</sup> 11,6 <sup>(d)</sup> , 69,1 <sup>(c)</sup>	
Insetos		
Blattela (barata)	10 <sup>(b)</sup> , 18,4 <sup>(c)</sup> , 35 <sup>(c)</sup>	
Bombyx (bicho-da-seda)	44,2 <sup>(c)</sup>	
Coleoptera (besouro)	5,0-15,0 <sup>(b)</sup>	
Diptera (mosca verdadeira)	54,8 <sup>(c)</sup>	
Galleria (larva)	33,7 <sup>(c)</sup>	
Gafanhoto	2,0-4,0 <sup>(a)</sup>	
Besouro de Maio	16,0 <sup>(b)</sup>	
Periplaneta (barata)	2,0 <sup>(c)</sup>	
Pieris (borboleta)	64,0 <sup>(c)</sup>	

a) massa úmida do corpo; b) massa seca do corpo; c) fração orgânica da cutícula; d) massa total seca da cutícula; e) massa seca do abdômen; f) massa seca das cascas; g) massa seca da parede celular.

Fonte: Adaptação de Filho et al., 2007.

#### 2.3. Processo de extração da quitina

A extração de quitina é favorecida pela abundância do biomaterial na natureza, podendo ser extraída de diversas biomassas e de matérias-primas relativamente baratas, como é o caso de muitos insetos (FILHO *et al.*, 2007).

A α-quitina ocorre na endocutícula associada a pigmentos, carbonatos e proteínas e, assim, sua extração a partir de exoesqueletos de crustáceos envolve, usualmente, a sequência desmineralização, desproteinização e despigmentação (FILHO *et al.*, 2007). Essa mesma sequência de tratamentos tem sido aplicada para extração de quitina de insetos (MOURA *et al.*, 2006).

As soluções aquosas de diferentes ácidos, como HCl, HNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, HCOOH, H<sub>3</sub>CCOOH, podem ser utilizadas na desmineralização, etapa onde são eliminados os sais minerais, principalmente carbonato e fosfato de cálcio. O tratamento pode ser realizado em diferentes condições, a temperatura e o tempo podem variar entre 0 e 100°C e de 30 min até 48 horas respectivamente (FILHO *et al.*, 2007)

As proteínas podem ser eliminadas por tratamento contendo soluções aquosas de diferentes bases, entre elas NaOH, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, KOH, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Ca(OH)<sub>2</sub>, porém, o emprego de NaOH (1-10%) e de temperaturas relativamente elevadas (65 - 100°C) é a prática mais comum (FILHO *et al.*, 2007; MOURA *et al.*, 2006). Os tratamentos enzimáticos utilizando pepsina, tripsina, alcalases e outras proteases não quitinolíticas também podem ser empregadas (FILHO *et al.*, 2007; LUCAS *et al.*, 2021).

A remoção de pigmentos, quando presentes, pode ser realizada por extração de solventes, o etanol e a acetona são os mais empregados, ou por branqueamento com  $KMnO_4$ , NaOCI ou  $H_2O_2$  (FILHO *et al.*, 2007).

Na pesquisa de Battisti & Campana-filho (2008) para a obtenção e caracterização de de α-quitina e quitosanas de cascas de Camarão de água doce (*Macrobrachium rosembergii*), a quitina foi extraída através de duas sequências distintas. Na primeira sequência o material foi desproteinizado e em seguida desmineralizado, enquanto que na segunda a ordem de execução das etapas foi invertida. Os autores determinaram que ambas as sequências permitiram a extração de quitina com baixos teores de cálcio e magnésio, a primeira levou maiores rendimentos

de extração, enquanto a sequência 2 resultou em menores teores de compostos inorgânicos.

Autores que estudam a extração de quitina de insetos utilizam metodologias semelhantes das já utilizadas para crustáceos, como é o caso de Son *et al.* (2018) os autores determinaram a composição de carboidratos e realizaram a caracterização da quitina e quitosana presentes na larva de *Tenebrio molitor* os autores utilizaram o processo de desproteinização e posteriormente desmineralização para a extração da quitina presente no material. O rendimento de quitina (%) apresentou um valor de 4,72 ± 0,21, valor inferior ao obtido de insetos como gafanhotos (4,71 - 11,84%) ou grilos (8,7%), essa diferença ocorre uma vez que quando insetos adultos, gafanhotos e grilos possuem cutículas bem desenvolvidas.

Badawy & Mohamed (2015) realizaram a extração da quitina de diferentes tipos de insetos, entre eles baratas, vespas, besouros, percevejos e gafanhotos. Como processo inicial utilizou-se a desproteinização com hidróxido de potássio (KOH) 10% a 40°C durante 48 horas e posteriormente a lavagem do material foi feita com água destilada até neutralização do pH. Após este processo, foi realizada a desmineralização do material, utilizando 5% de ácido acético glacial a 55°C durante 2 horas e desidratação utilizando uma série de concentrações (30 a 100%) de álcool etílico. Os autores determinaram que a quitina presente em insetos é uma boa fonte para a produção de quitosana, especialmente a das cutículas de insetos que apresentam baixos níveis de material inorgânico, o que torna sua desacetilação mais fácil em comparação ao uso de cascas de camarão.

O trabalho realizado por Lucas *et al.* (2021) buscou estudar a extração, caracterização físico-química e propriedades morfológicas de quitina e quitosana presente na cutículas de insetos comestíveis. Para a extração da quitina de *Tenebrio molitor* realizou-se uma etapa de desproteinização enzimática, esse processo apresentou eficiência de 85%. Os autores optaram por não utilizar o processo de desmineralização, uma vez que, após testes preliminares o rendimento após a desmineralização mostrou-se baixo (40,7% da amostra foi perdida durante o processo)

e o teor de cinzas não diminuiu o suficiente (3,6% para 2,8%) para justificar a quantidade de ácido utilizada durante o processo e a grande quantidade de água necessária.

## 2.4. Quitosana e aplicações

A quitosana é obtida pelo processo de desacetilação alcalina da quitina, assim como mostra a figura 4. Este biomaterial tem sido investigado como matéria-prima na obtenção de biofilmes plásticos. (AZEVEDO *et al.*, 2007).

Figura 4 - Desacetilação alcalina

Fonte: Spin-neto & et al., 2008.

A quitosana é um produto natural, que apresenta baixo custo, é biodegradável e renovável, apresentando grande importância ambiental e econômica (AZEVEDO *et al.*, 2007)

Na agricultura, a quitosana tem sido aplicada como biofilme de revestimento na preservação de frutas, legumes e sementes contra a deterioração por microrganismos, para estimular o sistema imune da planta e proteger a planta de ataques de patógenos (BERGER *et al.*, 2011)

Pinto *et al.*, (2018) avaliou a produção de bioplástico a partir de quitosana com aplicação biomédica, sendo observado vasto potencial terapêutico atribuído às propriedades de biodegradabilidade e atividade antimicrobiana dos plásticos.

O aumento de lixo não biodegradável, em conjunto com as dificuldades de reciclagem de grande parte de embalagens constituídas de polímeros sintéticas, representa grandes problemas ambientais que locais industrialmente avançados enfrentam, sendo observado grande número de pesquisas visando o desenvolvimento

de materiais que apresentam segurança ecológica, como o caso de polímeros biodegradáveis (PELISSARI, 2009).

#### **3 METODOLOGIA**

## 3.1. Preparo das exúvias e dos insetos inteiros

#### 3.1.1. Insetos

Os insetos (larvas de *Tenebrio molitor*) já abatidos por congelamento e as exúvias utilizados no projeto foram doados pela empresa Agrin - Criação e Comércio de Insetos. Os materiais foram mantidos congelados a -18°C até o momento de uso.

#### 3.1.2. Farinha de insetos inteiros

Os insetos inteiros foram liofilizados durante 48 horas para remoção da umidade. Posteriormente, o material foi triturado e peneirado. Para a extração da quitina de *Tenebrio molitor* integral, selecionou-se o material retido em peneira com abertura de 600µm.

#### 3.1.3. Preparo das exúvias

Para a obtenção da farinha de exúvia, o material foi triturado e peneirado, não passando por nenhum tratamento prévio. Para a extração da quitina das exúvias, selecionou-se o material retido na peneira com abertura de 600 µm.

## 3.2. Ensaios de extração de quitina

A metodologia foi adaptada de Battisti & Campana-Filho. (2008). A extração da quitina de insetos e exúvias foi avaliada em 2 sequências distintas, conforme figura 5.

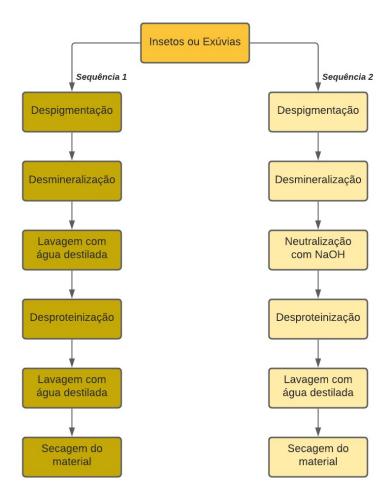


Figura 5 - Sequências de extração da quitina

Ao final de cada sequência avaliou-se a quantidade de efluentes (material líquido gerado durante as extrações que não apresenta aplicação no projeto) e a quantidade de quitina obtida (material sólido obtido ao final dos processos). O rendimento (R) dos processos foi calculado conforme equação 1.

$$R(\%) = \frac{\text{quantidade de material sólido ao final da sequência}(g)*100}{\text{quantidade de material farinha inicial }(g)} \qquad \text{eq.(1)}$$

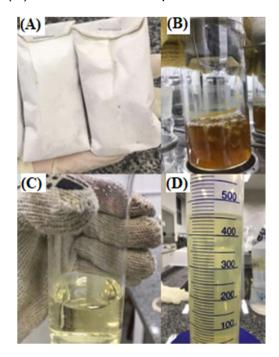
A proporção (P) entre o rendimento e a quantidade de efluentes gerados foi calculada pela equação 2.

$$P = \frac{R(\%)}{Volume \ de \ efluente \ gerado \ (L)} \quad \text{eq. (2)}$$

## 3.2.1. Despigmentação e remoção de lipídios

O processo de despigmentação e extração de lipídios foi realizado em equipamento tipo Soxhlet, utilizando como solução extratora o álcool etílico 95%. A extração foi realizada por 4 horas consecutivas, houve uma troca do álcool etílico utilizado a cada 2 horas. A massa inicial de farinha de inseto ou de exúvia foi de 25 g.

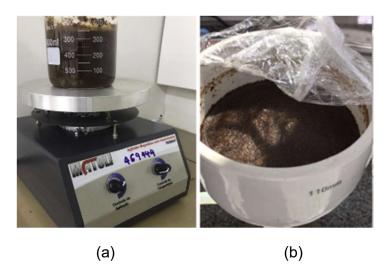
Figura 6 - Despigmentação e remoção de lipídios. Sendo (A): preparação do material para o processo; (B): álcool etílico 95% após 2 horas de processo; (C): álcool etílico 95% ao final do processo e (D): resíduo médio do processo.



#### 3.2.2. Desmineralização

O material sólido remanescente do processo de despigmentação foi adicionado de 375 mL de HCl 1M, permanecendo em agitação constante, a temperatura ambiente, durante o período de 22 horas para a sequência 1 e o período de 2 horas para a sequência 2. Posteriormente, o material resultante da sequência 1 passou pelo processo de filtração a vácuo em papel filtro qualitativo e lavagem com água destilada até que o efluente atingisse pH 5. Para a sequência 2, adicionou-se NaOH 15% (m/v) até que o material alcançasse pH 7.

Figura 7 - Processo de desmineralização. Sendo (a): reação com HCl e (b): filtração.



Posteriormente, o material sólido das sequências passou pelo processo de secagem em estufa durante o período de 24 horas a 30°C .

## 3.2.3. Desproteinização

Adicionou-se 250 mL de solução aquosa de NaOH 15% (m/v) ao material sólido remanescente da etapa anterior e, então, a mistura foi deixada por 3 horas a 65°C, sendo agitada manualmente a cada 20 minutos. Em seguida, o material passou pelo processo de filtração sendo lavado com água destilada até que a mesma atingisse neutralidade (pH 7). Após esta etapa, o material sólido retido no filtro foi seco em estufa a 40°C e estocado até o momento da análise. Este material sólido foi denominado de quitina bruta de exúvia (QBE) e quitina bruta de inseto inteiro (QBI).

## 3.3. Análise da quitina

A composição centesimal da quitina foi avaliada de acordo com os métodos de análise de alimentos do Instituto Adolfo Lutz (1985). Todas as análises foram realizadas em triplicatas. A umidade das farinhas e das quitinas brutas foi removida através de secagem em estufa a 105°C por 24h, antes das demais análises.

#### 3.3.1. Determinação de cinzas

A análise de cinzas foi realizada em forno mufla a 550°C por 3 horas. Os valores médios utilizados variaram conforme a disponibilidade e rendimento do material. Para a exúvia de *Tenebrio molitor* utilizou-se um valor médio de 0,75 g de material, para a larva de *Tenebrio molitor* íntegro esse valor foi de 0,25 g. Os valores foram alterados para o material sem tratamento, para a exúvia de *Tenebrio molitor* sem tratamento o valor utilizado foi de 0,25 g e para a larva de *Tenebrio molitor* íntegro sem tratamento o valor foi de 1,5 g. Para a determinação de cinzas utilizou-se a equação 3.

$$cinzas (g/100g) = \frac{(Peso\ final\ (cadinho + amostra) - Peso\ do\ cadinho)*100}{Peso\ amostra}$$
 eq.(3)

# 3.3.2. Determinação do teor de nitrogênio total

O teor de nitrogênio total foi realizado pelo método de Kjeldahl. O catalisador utilizado foi composto de sulfato de cobre e sulfato de sódio. A digestão foi realizada a 400°C (utilizando uma rampa de aumento gradativo de temperatura). A destilação foi realizada em aparelho micro-kjeldahl utilizando NaOH 40% (m/v) e a amônia formada foi coletada em ácido bórico 4% (m/v). O material foi titulado com ácido clorídrico 0,1M padronizado. O peso da amostra utilizada foi de 0,15 g para todos os ensaios. A quantidade de nitrogênio total, então, foi calculada através da equação 4.

$$Nitrog\hat{e}nio (g/100g) = \frac{VHCL \times N \times 14 \times 100}{Massa da \ amostra \times 1000}$$
 eq.(4)

Onde, VHCL é o volume de HCl 0,1M utilizando na titulação; N é a normalidade real do ácido padronizado.

#### 3.3.3. Açúcares redutores

Para a determinação dos açúcares redutores presentes nas quitinas butas (QBE e QBI), utilizou-se uma solução aquosa de quitina 3,5 mg/mL, a qual foi submetida à análise de DNS descrito por Miller *et al.* (1959), com adaptações. De forma sucinta, uma alíquota de 190 µL de amostra foi transferida para tubos de ensaio contendo 190

μL de solução DNS e serão incubados em banho-maria em ebulição durante o período de 5 minutos. Posteriormente, os tubos foram resfriados em banho de gelo e, então, adicionados de 1,2 mL de solução de tartarato de sódio e potássio hidratado (15,1 g/L). Foi determinada a absorbância da solução medida a 540 nm e a quantidade de açúcares redutores, expressos em glicose, foi calculada utilizando uma curva de calibração de glicose com 5 pontos em triplicata. A análise indica a quantidade de açúcares redutores (monossacarídeos) presentes na matéria-prima.

### 3.3.4. Açúcares redutores totais

A determinação dos açúcares redutores totais (ART) presentes nas quitinas brutas (QBE e QBI) foi realizada pelo método do DNS, conforme descrito no item 3.3.3, no entanto, previamente, as quitinas foram hidrolisadas.

A hidrólise foi realizada incubando-se 17,5mg de amostra e 1 mL ácido clorídrico 2N em banho-maria em ebulição por 5 minutos. Em seguida os tubos de ensaio foram resfriados em banho de gelo e a mistura da reação foi neutralizada pela adição de 1 mL de solução de hidróxido de sódio 2N. Essa mistura foi avaliada em relação à concentração de açúcares redutores expressos em glicose equivalente. A hidrólise ácida realiza a quebra da molécula permitindo analisar outros açúcares como o caso de polissacarídeos.

#### 3.4. Análise estatística

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

# **4. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

## 4.1. Rendimento do processo e quantificação dos efluentes gerados

A quantidade de quitina bruta foi avaliada pelo cálculo do rendimento em massa de quitina em relação ao material de partida para a extração. A quantidade de efluente

gerado nos processos foi avaliado pela relação entre o rendimento do processo em termos de quitina bruta obtida e a quantidade de efluente gerado. A figura 8 ilustra a quantidade de efluentes gerados no processo de desproteinização da sequência 1.

Figura 8 - Demonstração do resíduo gerado pelo processo de desproteinização para a sequência de extração 1



# 4.1.1. Extração da quitina bruta de exúvia de *Tenebrio molitor* (QBE)

As figuras 9 e 10 demonstram os resultados do rendimento da QBE e a proporção de QBE em relação aos efluentes gerados nas duas sequências de extração. A sequência 1 apresentou um rendimento médio para a QBE de 18% enquanto na sequência 2 esse valor foi de 32%. Em relação a proporção de QBE por

quantidade de efluente gerado, observa-se que este valor foi de 163,72% superior na sequência 2, indicando que a quantidade de efluente gerada foi inferior.

Figura 9 - Rendimento (%) das sequências de extração de QBE das sequências 1 e 2. Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as amostras (p<0,05).

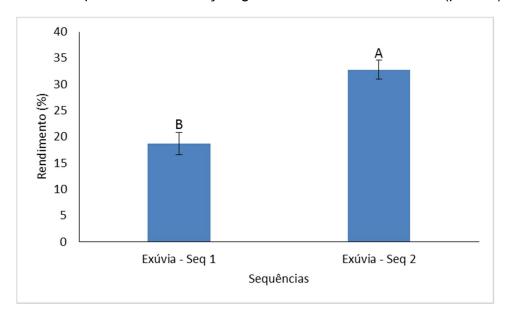
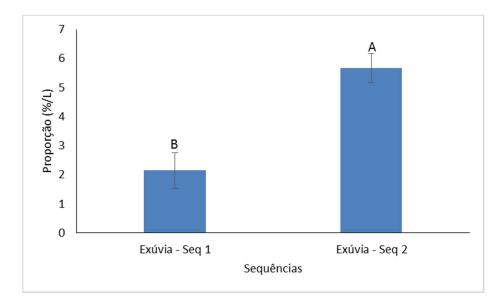


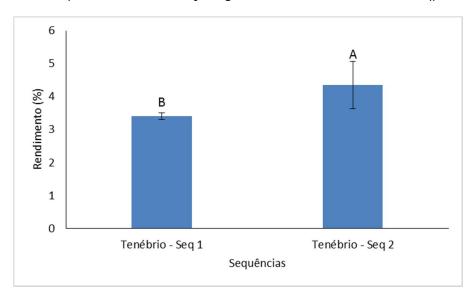
Figura 10 - Proporção (%/L) de QBE das sequências 1 e 2. Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as amostras (p<0,05).



# 4.1.2. Extração da quitina bruta da larva de Tenebrio molitor íntegro (QBI)

As figuras 11 e 12 demonstram os resultados do rendimento da QBI e a proporção de QBI em relação aos efluentes gerados nas duas sequências de extração. A sequência 1 apresentou um rendimento médio para a QBI de 3,41% enquanto na sequência 2 esse valor foi de 4,36%. Em relação a proporção de QBI por quantidade de efluente gerado, observa-se que este valor foi 147,91% superior na sequência 2, indicando que a quantidade de efluente gerada foi inferior.

Figura 11 - Rendimento (%) dos processos de extração de QBI das sequências 1 e 2. Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as amostras (p<0,05).



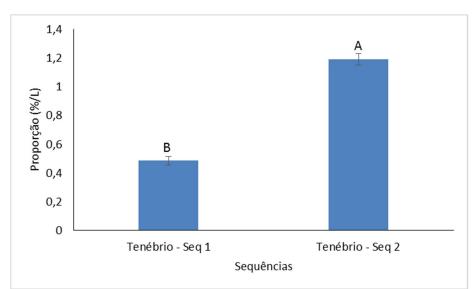


Figura 12 - Proporção (%/L) para QBI das sequências 1 e 2. Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as amostras (p<0,05).

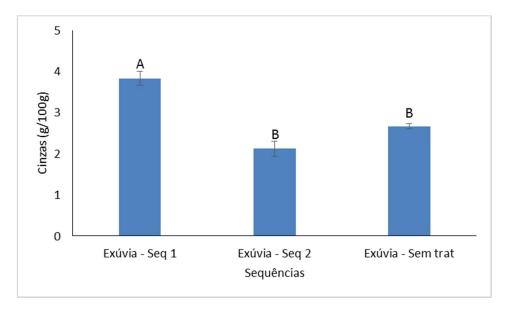
Assim como observado para a quitina de exúvia, a sequência de extração 2 apresentou menor quantidade de efluentes gerados e maior quantidade de quitina bruta ao final do processo.

# 4.2. Determinação do teor de Cinzas nas quitinas brutas

#### 4.2.1. Teor de cinzas na QBE

A figura 13 apresenta a análise do teor de cinzas (%) para a QBE obtida nas sequências 1 e 2. A QBE obtida na sequência 2 e a exúvia sem tratamento não apresentaram diferenças significativas em relação ao teor de cinzas, o qual ficou, em média, em 2,27 ± 0,06%. Na sequência 1, a QBE apresentou 2 vezes mais cinzas que na sequência 2, estando o valor em torno de 4%.

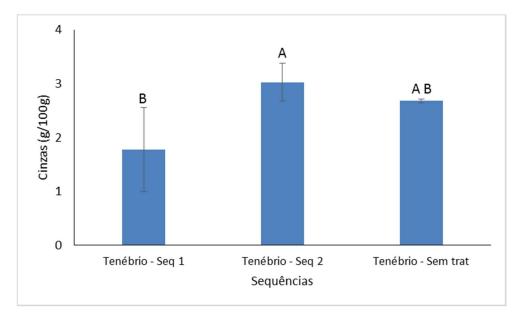
Figura 13 - Teor de Cinzas (%) para QBE das sequências 1 e 2 e exúvia sem tratamento. Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as amostras (p<0,05).



### 4.2.2. Teor de cinzas na QBI

A figura 14 apresenta a análise do teor de cinzas (%) para a QBI obtida nas sequências 1 e 2 de extração e para o inseto sem tratamento. As larvas de *Tenebrio molitor* sem tratamento não apresentou diferenças significativas em relação ao teor de cinzas das sequências 1 e 2. A sequência 2 apresentou valores superiores em relação ao tratamento 1. Estes resultados estão coerentes com o apontado por Lucas *et al.* (2021) que descreve o processo de desmineralização como pouco efetivo durante a extração de quitina de *Tenebrio molitor*.

Figura 14 - Teor de Cinzas (%) de QBI das sequências 1 e 2 e larvas de *Tenebrio molitor* sem tratamento. Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as amostras (p<0,05).

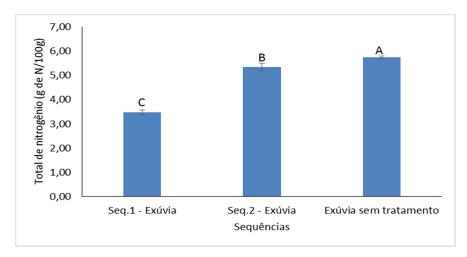


# 4.3. Determinação do teor de nitrogênio total

# 4.3.1. Teor de nitrogênio total para a QBE

A figura 15 apresenta a análise de nitrogênio total (%) para as QBEs obtidas nas sequências de extração 1 e 2.

Figura 15 - Teor de nitrogênio total para QBE das sequências 1 e 2 e exúvia sem tratamento. Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as amostras (p<0,05).



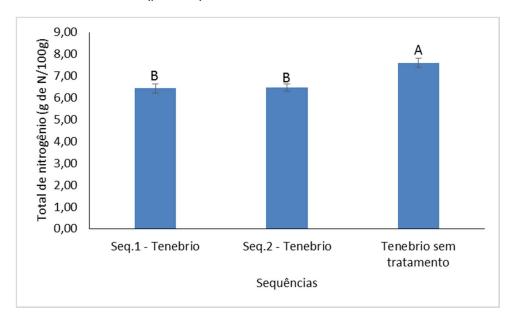
A QBE obtida na sequência 2 apresentou, em média, 5% de nitrogênio, valor significativamente inferior ao determinado para as exúvias sem tratamento e superior ao obtido na sequência 1. Esse resultado indica que parte do nitrogênio encontrado nas exúvias foram removidos pelos dois tratamentos estudados, o que era desejado, uma vez que ocorre a remoção das proteínas presentes no material, devendo restar apenas o nitrogênio presente nas moléculas da quitina. As etapas de lavagem e transferências do material sólido nos dois processos implica em perdas, sendo que na sequência 1 essa perda pode ter sido maior. Para refinar esse resultado e identificar se parte das proteínas não ficaram ainda retidas na quitina obtida pela sequência 2, os materiais podem, na continuidade deste estudo, ser submetido à quantificação de proteínas por métodos específicos, tal como o método Bradford ou análise de aminoácidos, diferenciando a quantidade de nitrogênio protéico e não protéico.

# 4.3.2. Teor de nitrogênio total para a QBI

A figura 16 apresenta o teor de nitrogênio total para a QBI. A larva de *Tenebrio molitor* apresentou, em média, 7,6% de nitrogênio, valor significativamente superior às sequências 1 e 2. As sequências 1 e 2 não apresentaram diferenças significativas em relação aos valores de nitrogênio, que ficou, em média, em 6,5%. O teor de nitrogênio para o inseto inteiro e a quitina dele obtida foram superiores aos encontrados nas

exúvias, o que era esperado, uma vez que o inseto inteiro apresenta teor de proteína e de quitina (principais fontes de nitrogênio deste inseto) superiores à exúvia isolada. Da mesma forma que citado no item anterior, é interessante aplicar um método para quantificação de proteínas mais específico, podendo diferenciar o nitrogênio protéico do não protéico.

Figura 16 - Teor de nitrogênio total para QBI das sequências 1 e 2 e larvas de *Tenebrio molitor* sem tratamento. Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as amostras (p<0,05).



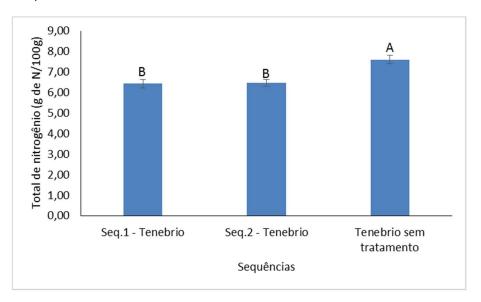
## 4.4. Quantificação de açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART)

## 4.4.1. Quantificação de AR e ART na QBE

A determinação de açúcares redutores (AR) nas exúvias da sequência 1 e 2 apresentaram valores inferiores ao limite de detecção do método analítico utilizado, o que indica que o teor de AR nas amostras estaria abaixo de 3 mg/100g de amostra. Para as exúvias sem tratamento, o teor de AR ficou em 7,99 ± 4,26 g/100g de exúvia.

Em termos dos açúcares redutores totais, que englobam os açúcares redutores provenientes da hidrólise ácida das QBEs, a figura 17 apresenta os teores obtidos em cada sequência.

Figura 17 - Açúcares redutores totais (%) para a QBI dos tratamentos 1 e 2 e exúvia sem tratamento. Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as amostras (p<0,05).



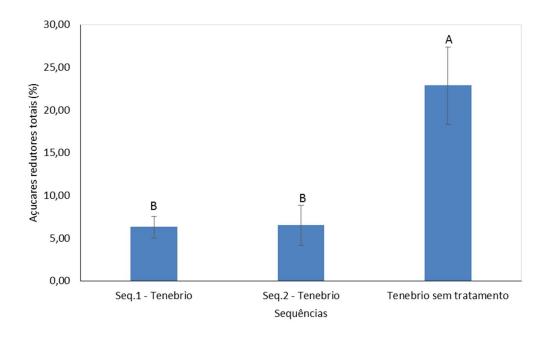
A exúvia sem tratamento apresentou valores elevados de açúcares redutores totais ( $81.8 \pm 0.9\%$ ) quando comparada às sequências de extração. A sequência 2 apresentou valores de açúcares redutores totais inferiores à sequência 1, ambas com valores entre 60 e 70% de ART, o que indica a presença de impurezas, provavelmente proteínas, ou uma dificuldade em realizar a hidrólise completa do material tratado.

### 4.4.2. Quantificação de AR e ART na QBI

De forma similar ao observado para a QBE, o teor de AR na QBI foi indetectável pelo método utilizado para as duas sequências. No entanto, para a larva de *Tenebrio molitor* sem tratamento o valor de AR ficou em 28,9 ± 0,9%, valor superior ao encontrado para as exúvias sem tratamento. Esse fato era esperado uma vez que a larva do inseto íntegro apresenta açúcares simples em sua composição.

Em relação aos açúcares redutores totais (ART), a figura 18 apresenta os teores obtidos em cada sequência.

Figura 18 - Açúcares redutores totais (%) para a QBI dos tratamentos 1 e 2 e larvas de *Tenebrio molitor* sem tratamento.



Observa-se que o teor de ART, como esperado, para a larva de *Tenebrio molitor* sem tratamento foi superior aos valores obtidos nas duas extrações, estando este valor em torno de 23%. Os valores de ART nas duas sequências foi baixo (em torno de 6,5%) indicando a presença de impurezas em quantidades superiores às observadas para a QBE.

#### 5 CONCLUSÃO

A pesquisa realizada relatou a possibilidade de obtenção de quitina de *Tenebrio molitor* em ambas sequências de extração, em quantidades relevantes. A sequência de extração 2 apresentou valores elevados de rendimento e menores quantidades de efluente geradas, sendo que para a exúvia de *Tenebrio molitor* houve uma redução de 38,4% na quantidade de efluente gerada e aumento de 74,95% no rendimento da QBE.

Para a larva do inseto íntegro houve uma redução de 33,9% na quantidade de efluente gerada e aumento de 27,85% no rendimento da QBE.

Desta forma conclui-se que a extração de quitina de insetos pode ser simplificada, reduzindo a geração de efluente gerada e aumentando o rendimento de quitina bruta ao final do processo.

### **REFERÊNCIAS**

ADÁMKOVÁ, A; MLČEK, J; KOUŘIMSKÁ, L; BORKOVCOVÁ, M; BUŠINA, T; ADÁMEK, M; BEDNÁŘOVÁ, M; KRAJSA, J. Nutritional Potential of Selected Insect Species Reared on the Island of Sumatra. **Int J Environ Res Public Health**, v.14, n.521. doi: 10.3390/ijerph14050521. 2017.

AGUADO, P; AYUGA, F; BRIASSOULIS, D; PANAGAKIS, P; FEBO, P; COMPARETTI, A; SCARASCIA-MUGNOZZA, G; O`DONNELL, C; NAVICKAS, K; FEHRMANN, J. The transition from Agricultural to Biosystems Engineering University Studies in Europe. in: The 9th International Conference on Education and Information Systems, Technologies and Applications. p. 1-6. Orlando, 2011.

ANTONINO, N. A. Otimização do processo de obtenção de quitina e quitosana de exoesqueletos de camarões oriundos da indústria pesqueira paraibana. 2007. 88 p. Dissertação (mestrado em química) - Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2007.

AZEVEDO, V. V. C; CHAVES, S. A; BEZERRA, D. C; LIA FOOK, M. V; COSTA, A. C. F. M. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.2, n.3, p. 27-34. 2007.

BADAWY, R; MOHAMED, H. I. Chitin extraction, Composition of Different Six Insect Species and Their Comparable Characteristics with That of the Shrim. **Journal of American Science**. v. 11, n.6, p. 127-134. 2015.

BATTISTI, M. V; CAMPANA- FILHO, S. P. Obtenção e caracterização de α-quitina e quitosanas de cascas de Macrobrachium rosembergii. **Resvita Quím. Nova**, vol.3, n.8, p. 2014-2019. São Paulo, 2008.

BERGER, L. R. R; STAMFORD, E. C. M; STAMFORD, N. P. PERSPECTIVAS PARA O USO DA QUITOSANA NA AGRICULTURA. **Revista Iberoamericana de Polímeros**. v.12, n.4, p. 195-215. 2011.

BEZERRA, A. M. Prospecção quantitativa e qualitativa de uma nova fonte renovável de quitosana. 2015. 116 p. Tese (doutorado em tecnologia químico-farmacêutica) - Universidade de São Paulo. São Paulo, 2015.

Bhavsar, P. S; Dalla Fontana, G; Zoccola, M. Sustainable superheated water hydrolysis of black soldier fly exuviae for chitin extraction and use of the obtained chitosan in the textile field. **ACS Omega,** n. 6, 8884–8893. 2021

CAMPANA-FILHO, S. P; BRITTO, D; CURTI, E; ABREU, F. R; CARDOSO, M. B; BATTISTI, M. V; SIM, P. C; GOY, R. C; SIGNINI, R; LAVALL, R. L. Extração, estruturas e propriedades de α- e β-quitina. Revista química nova. v.30, n.3, p. 644-650, 2007.

COSTA, S. M. PROTEÍNAS DE LARVAS DE Tenebrio molitor (L., 1758): EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO NUM PRODUTO ALIMENTAR. 2017. 79 p. Dissertação (mestrado em segurança alimentar) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa. Lisboa, 2017

DOURADO, L. R. B; LOPES, P. M; SILVA, V. K; CARVALHO, F. L. A; MOURA, F. A. S;SILVA, K. B; GIANNECCHINI, L. G; PINHEIRO, S. R. F; BIAGIOTTI, D; KIMPARA, H. M. Chemical composition and nutrient digestibility of insect meal for broiler. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v.92, n.3, p. 1-5. 2020.

EFSA. Safety of dried yellow mealworm (Tenebrio molitor larva) as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. **EFSA JOURNAL**, v.19. n.1. 2021.

EMBRAPA. Pesquisa internacional indica insetos para alimentar peixes e aves. **EMBRAPA**, Brasília, 09 out. 2018. Disponível em: https://www.embrapa.br/busca-denoticias/-/noticia/38255593/pesquisa-internacional-indica-insetos-para-alimentar-peixes-e-aves

FELIPE. L. O; RABELLO, L. A; JUNIOR, E. N. O; SANTOS, I. J. B. Quitosana: da química básica à bioengenharia. **Quím. nova esc,** v.39, n.4, p. 312-320. 2017.

Finke, M. D. Estimate of chitin in raw whole insects. **Zoo Biol**, v. 26, n.2, p. 105-15. 2017.

HIRATA, W; MOYSES, C. Study of the physicochemical and functional properties of Tenebrio molitor larvae flour and its application in meat products. In: ANAIS DO 14 SLACA - SIMPSÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 2021, Campinas. **Anais eletrônicos**. Campinas, Galoá, 2021.

Instituto Adolfo Lutz (São Paulo). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos.** Coordenadores Lara, A. B. W. *et al.* São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985.

KULMANN, I; SANTOS, E. M; BERNARDES, R. P; KULMANN, L. S; WERNER, F. M; SILVA, F. F. PERCEPÇÃO SOBRE ENTOMOFAGIA E INTENÇÃO DE CONSUMO DE PRODUTO ALIMENTAR UTILIZANDO INSETOS EM SUA COMPOSIÇÃO. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 9, n. 2. 2017.

LARANJEIRA, M. C. M; FÁVERE, V. T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Quím. Nova,** v.32, n.3, p. 672-678. 2009

LEHNINGER, T. M., NELSON, D. L. & COX, M. M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 7. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2019. cap. 7, p. 256.

Lucas, A. J. S; ORESTE, E. Q; COSTA, H. L. G; LÓPEZ, H. M; SAAD, C. D; PRENTICE, C. Extraction, physicochemical characterization, and morphological properties of chitin and chitosan from cuticles of edible insects. **Food Chemistry**, v.343, p. 1-11. 2021.

MERZENDORFER, H; ZIMOCH, L. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. **Journal of experimental biology**, v.206, p. 4393-4412. 2003.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, Washington, v. 31, n. 3. 1959.

MOURA, C. M; MUSZINISKI, P; SCHMIDT, C; ALMEIDA, J; PINTO, L. A. A. QUITINA E QUITOSANA PRODUZIDAS A PARTIR DE RESÍDUOS DE CAMARÃO E SIRI: AVALIAÇÃO DO PROCESSO EM ESCALA PILOTO. **VETOR - Revista De Ciências Exatas E Engenharias**, v.16, n.1, p. 37–45. 2006.

SPIN-NETO, R; PAVONE, C; FREITAS, R. B; MARCANTONIO, R. A. C; MARCANTONIO-JÚNIOR, E. Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica: revisão de literatura. **Revista de Odontologia da UNESP**. v.37, n.2, p. 155-161, 2008.

PELISSARI, F. Produção e caracterização de filmes de amido de mandioca, quitosana e glicerol com incorporação de óleo essencial de orégano. Dissertação (mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2009.

PINHEIRO, C. R. APLICAÇÃO E USO DE INSETOS (TENÉBRIO MOLITOR) NA ALIMENTAÇÃO HUMANA VISANDO OS BENEFÍCIOS NUTRICIONAIS QUE ELES FORNECEM AO CONSUMIDOR. pg. 504-51. 2018. Disponível em: <a href="https://www.agbbauru.org.br/publicacoes/Alimentando2ed/pdf/Alimentando2ed-42.pdf">https://www.agbbauru.org.br/publicacoes/Alimentando2ed/pdf/Alimentando2ed-42.pdf</a>>.

PINTO, E. P; TAVARES, W. S; MATOS, R. S; FERREIRA, A. M; MENEZES, R. P; COSTA, M. E. H. M; SOUZA, T. M; FERREIRA, I. M; SOUSA, F. F. O; ZAMORA, R. R. Influence of low and high glycerol concentrations on wettability and flexibility of chitosan biofilms. **Quim. Nova**, v.41, n. 10, p. 1109-1116, 2018.

Poincare, H. La science et l'hypothèse. Editora Presses Univ Franche-Comté, pg 25, vol. 607. 1902

Ribeiro, J. C. R. Estudo do potencial dos insetos comestíveis para aplicação na indústria alimentar. Dissertação (mestrado em bioquímica) - Universidade do Porto. Porto, 2017.

SILVA, F. K. P; BRUCK, D. W; BRUCK, W. M. Isolation of proteolytic bacteria from mealworm (*Tenebrio molitor*) exoskeletons to produce chitinous material. **FEMS Microbiology Letters**, v.364, n.17. 2017.

SILVA, H. S. R. H; SANTOS, K. S. C. R; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Quím. Nova, v.**29, n.4. 2006.

SON, Y; HWANG, I. K; NHO, C. W; KIM, S. M; KIM, S. H. Determination of Carbohydrate Composition in Mealworm (*Tenebrio molitor* L.) Larvae and Characterization of Mealworm Chitin and Chitosan. **Foods.** v.10, n.3, p. 1-15. 2021.

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.

TUBIN, J. S. FARINHA DE INSETOS NA ALIMENTAÇÃO DE TILÁPIAS EM SISTEMAS BIOFLOCOS E RECIRCULAÇÃO DE ÁGUA. Dissertação (mestrado em zootecnia) - Universidade do estado de Santa Catarina. Chapecó, 2017.

VANTOMME, P; HALLORAN, A. The contribution of insects to food security, livelihoods and the environment. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Italy, 2013.

ZHAO, X; ZHANG, J; ZHU, K. Y. Chito-Protein Matrices in Arthropod Exoskeletons and Peritrophic Matrices. In: COHEN, E. *et al.* **Extracellular Sugar-Based Biopolymers Matrices.** 2019. Springer; 1st ed. 2019.

# **ANEXO**

(Folha de aprovação do aluno)



FORMULÁRIO N.º 14/2022 - CBEB-AVR/DAE-AVR/DRG/AVR/IFSP

FOLHA DE APROVAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO
IDENTIFICAÇÃO DO(A) ALUNO(A)
Nome: Júlia Caroline Porfírio
<b>Título</b> : AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE QUITINA DE <i>Tenebrio molitor.</i>
Curso: Bacharelado em Engenharia de Biossistemas
BANCA EXAMINADORA
BANCA EXAMINADORA
Nome: Ma. Raissa Maria Mattos Gonçalves
Instituição/Departamento: IFSP - Câmpus Avaré
Nota: 9,7 Julgamento: ( x ) Aprovado ( ) Reprovado
Assinatura: [assinado eletronicamente]
Nome: Dr. Gustavo Pio Marchesi Krall Ciniciato
Instituição/Departamento: IFSP - Câmpus Avaré
Nota: 9,7 Julgamento: ( x ) Aprovado ( ) Reprovado
Assinatura: [assinado eletronicamente]
Nome: Marcela Pavan Bagagli
Instituição/Departamento: IFSP - Câmpus Avaré
Nota: 9,7 Julgamento: ( x ) Aprovado ( ) Reprovado
Assinatura: [assinado eletronicamente]

# **RESULTADO FINAL**

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

Documento assinado eletronicamente por:

- Marcela Pavan Bagagli, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 21/02/2022 15:57:41.
- Raissa Maria Mattos Goncalves, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 21/02/2022 16:26:20.
- Gustavo Pio Marchesi Krall Ciniciato, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 21/02/2022 16:39:31.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 21/02/2022. 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: 300307

Código de Autenticação: 9233149a06



FORMULÁRIO N.º 14/2022 - CBEB-AVR/DAE-AVR/DRG/AVR/IFSP

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

"Este documento não contém