

EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE QUITINA E QUITOSANA A PARTIR DA CUTÍCULA DE INSETOS COMESTÍVEIS

Sinara S. N. Machado¹, Jania B. A. da Silva^{2,3}, Renata Q. Nascimento⁴, Paulo V. F. Lemos⁴, Denílson J. Assis², Henrique R. Marcelino⁵, Carolina O. de Souza^{1,4,5*}

¹*Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador-BA, Brasil.*

²*Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Escola Politécnica, Universidade Federal da Bahia, Salvador-BA, Brasil.*

³*Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas-BA, Brasil.*

⁴*Programa de Doutorado em Biotecnologia – Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Universidade Federal da Bahia, Salvador-BA, Brasil.*

⁵*Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador-BA, Brasil. Universidade Federal da Bahia - R. Barão de Jeremoabo, 147 - Ondina, Salvador - BA, 40170-115.*

carolods@ufba.br

RESUMO

*A quitina é o segundo biopolímero mais abundante do planeta e está presente no exoesqueleto de artrópodes, incluindo insetos e mariscos. A quitosana, descrita como um derivado funcional da quitina, apresenta vasta aplicação industrial devido a sua biodegradabilidade, biocompatibilidade e propriedades funcionais. Como alternativa às fontes tradicionais para obtenção de quitosana, cutícula de inseto (*Zophobas morio*) foi proposta como uma fonte não convencional, mas viável, para obtenção de quitina e quitosana. A quitina foi extraída em três etapas (desmineralização, desproteinização e descoloração) e posteriormente desacetilada para obtenção da quitosana. Foi avaliado o rendimento, para quitina e quitosana, e o grau de desacetilação, solubilidade (ácido acético 1%), espectroscopia no infravermelho (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e viscosidade aparente para a quitosana. A quitosana comercial foi utilizada como amostra de referência para comparação. O rendimento da extração foi de 11,21% para a quitina e de 81,36% para a quitosana obtida a partir da massa seca de quitina. O rendimento de quitosana está condizente com os valores relatados para fontes convencionais (camarão e caranguejo), que é na faixa de 71% a 90%. O grau de desacetilação e a solubilidade da quitosana, características que afetam suas propriedades e aplicações, foram de 83,57% e 94,00%, respectivamente, valores compatíveis aos da quitosana comercial avaliada (81,46% e 94,39%). Para os resultados da caracterização do polímero pelas técnicas de FTIR e MEV, foi possível observar consistência com o grau de desacetilação da quitosana obtida, permitindo assim a diferenciação entre quitina e quitosana. A viscosidade da quitosana foi 235,87 mPa.s, valor próximo ao apresentado pela quitosana comercial (249,86 mPa.s), e reduziu à medida que a taxa de cisalhamento aumentou, demonstrando sua característica pseudoplástica. Os resultados demonstram que os resíduos (cutícula) da criação das larvas de *Zophobas morio* podem ser usados para obtenção alternativa de quitina e quitosana, com rendimento e características para diferentes aplicações.*

Palavras-chave: *Zophobas morio*, biopolímeros, fontes alternativas, insetos.

INTRODUÇÃO

A quitina é o segundo biopolímero mais abundante no planeta, presente no exoesqueleto de artrópodes, incluindo insetos, mariscos e na parede celular de fungos^(1,2). A quitosana é o seu principal derivado proveniente da desacetilação parcial de sua estrutura química. Esse biopolímero possui excelentes propriedades, como biodegradabilidade, não toxicidade, biocompatibilidade, atividade hemostática e atividade antimicrobiana⁽³⁾. O papel da quitina e da quitosana como biomateriais são indiscutíveis, conforme evidenciado pela literatura científica nos últimos anos. A fonte convencional de extração de quitina são os resíduos da indústria pesqueira, como cascas de caranguejo e cascas de camarão. Sendo a disponibilidade restrita às regiões costeiras como também a sazonalidade, uma vez que existem temporadas específicas para pesca de crustáceos⁽⁴⁾. Neste contexto, torna-se importante o estudo de fontes alternativas para extração de quitina. Os insetos, como um dos recursos biológicos mais abundantes em todo o mundo⁽⁵⁾, apresentam um exoesqueleto constituído em partes por quitina, o que os tornam uma fonte potencial e alternativa para a produção destes biopolímeros. Em adição, eles possuem baixo custo de produção, fácil manejo e alta disponibilidade. O *Zophobas morio* é uma espécie de besouro que sofre metamorfose completa e cujas larvas são conhecidas pelo nome geral de tenebrio gigante e são comumente usados como alimento para animais e humanos. Possui um ciclo de vida total que dura aproximadamente 6 meses e inclui quatro estágios: ovo, larva, pupa e adulto⁽⁶⁾. Eles são facilmente cultivados⁽⁷⁾ e esse manejo gera uma quantidade significativa de resíduos provenientes das constantes trocas de seus exoesqueletos (cutículas) ao longo dos seus ciclos de vida até chegar a fase adulta. Desta forma, este estudo, objetivou propor a utilização dos resíduos (cutículas) de larvas de *Zophobas morio* como fonte alternativa para a extração de quitina e quitosana, sendo esta uma possibilidade para o uso integral do inseto, reduzindo significativamente o acúmulo de resíduos durante o manejo e contribuindo para a sustentabilidade.

MATERIAIS E MÉTODOS

As cutículas das larvas do espécime *Zophobas morio*, foram fornecidos pelo Laboratório de Pesquisa em Biomateriais e Inovação – (LAPBIM) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia (UFBA). A quitosana (CAS: 9012-76-4) utilizada como material de referência neste estudo foi adquirida da Sigma Aldrich.

Extração da quitina e quitosana

A extração foi realizada em três etapas, desmineralização, desproteínização e descoloração de acordo com Kaya et al., (2014)⁽¹⁾. Desmineralização: 5g da cutícula foi misturada com 100 mL de HCl 1,0 M a 60°C e 100 rpm por 1h:30. Desproteínização: A amostra foi tratada com 100 mL de NaOH 1M a 100°C e 100 rpm por 20 horas. Descoloração: nesta etapa a amostra foi submetida a uma solução de água destilada, etanol 95% e clorofórmio (4:2:1) por 2 horas, sendo posteriormente filtrada e seca em estufa com circulação de ar (50°C/6h). A quitina seca obtida foi pesada para determinação do rendimento e posteriormente 0,5g foi desacetilada com 50mL de solução a 60% de NaOH (20h a 100 °C e 100 rpm) e seca em estufa (50°C/6h) para obtenção da quitosana, conforme o método descrito por de Jantzen da Silva Lucas et al., (2021)⁽⁸⁾.

Caracterização físico-química da quitina e quitosana

A análise da estrutura química das amostras foi realizada por FTIR (Perkin Elmer), suportada em brometo de potássio (KBr), na região espectral de 4000 a 400 cm^{-1} . A morfologia da quitina, bem como da quitosana, foi realizada em Microscópio Eletrônico de Varredura modelo JEOL (JSM-6390LV), com prévia metalização com ouro. Para a determinação do grau de desacetilação (DD) o método utilizado foi titulação potenciométrica, conforme a equação A ⁽⁸⁾.

$$\text{DD (\%)} = 2.03 \times (V_2 - V_1) / [M + 0.0042 \times (V_2 - V_1)] \quad (\text{A})$$

Onde: M é o peso da amostra, V_1 e V_2 são os volumes de solução de NaOH a 0,1 mol.L⁻¹. 2,03 é o coeficiente resultante do peso da unidade em monômero de quitina e 0,0042 o coeficiente resultante da diferença entre pesos moleculares de unidades monoméricas de quitina e quitosana.

A solubilidade foi analisada utilizando o método proposto por Luo e seus colaboradores ⁽⁹⁾, onde 0,05 g de quitosana foi pesada em tubo e dissolvida em 10 mL de ácido acético aquoso 1% a 30°C sob agitação por 1 h e posterior centrifugação. A solubilidade foi calculada conforme equação B.

$$(M_1 - M_2) / (M_1 - M_0) \times 100 \quad (\text{B})$$

Onde: M_0 é o peso inicial do tubo, M_1 e M_2 são o peso inicial e final do tubo com a amostra, respectivamente).

A análise reológica foi realizada de acordo com o método descrito por Da Silva e seus colaboradores ⁽¹⁰⁾. As medidas foram realizadas em um reômetro (Haake Rheotest, Mod. 2.1, Medingem, Alemanha) com cilindros acoplados a um banho maria (a 25°C) para controle de temperatura e taxa de cisalhamento entre 25 e 1000 s^{-1} .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O rendimento da quitina extraída em peso seco da cutícula das larvas do *Zophobas morio* foi de 11,21%±0,55, percentual condizente com os obtidos de fontes convencionais (camarão, caranguejo, lagosta e choco) que variaram na faixa de 7,40 a 37% ⁽¹¹⁻¹³⁾ e de outras espécies de insetos (4,71% para *Melanogryllus desertus* e 20% para *Calliptamus barbarus*) ⁽¹⁴⁻¹⁶⁾. A quitosana obtida a partir da massa seca de quitina apresentou rendimento de 81,36%±1,35. Estudos mostram que quitosana extraída de fontes convencionais (camarão, carangueijo, lagosta) apresenta rendimentos entre 71% e 90% ^(17,18), enquanto a extraída de insetos, a variação é de 66% a 96,75% ^(16,19,20). A Figura 1 mostra os espectros de FTIR da quitina e quitosana obtidas neste estudo e da quitosana comercial. No espectro da quitina foi encontrada a banda de C=O dividida em dois picos (1622 e 1654 cm^{-1}), que é característica da α -quitina ⁽¹⁵⁾ e banda em 1551 cm^{-1} , correspondente à mistura de dois modos vibracionais, N-H no plano e o estiramento C-H, que é chamada de amida II. Estudos anteriores relatam que α -quitina é comumente encontrada em estruturas dos insetos ^(2,8,16). Quando comparamos a quitosana obtida neste estudo e a comercial, são notadas semelhanças. Uma banda larga é observada para os espectros na região de 3.000-3.600 cm^{-1} , que corresponde ao alongamento das ligações O-H e N-H ⁽⁸⁾. Como esperado, a banda em 1654 cm^{-1} (C=O) do grupo NHCOCH_3 (banda Amida I) na amostra de quitosana foi enfraquecida, indicando que a desacetilação foi bem-sucedida. Os resultados apresentados pelos espectros das amostras de quitina e quitosana deste estudo estão de acordo aos descritos na literatura e nos dão subsídios para inferir que foi extraída quitina da cutícula do *Zophobas morio* e que houve desacetilação da mesma para obtenção da quitosana.

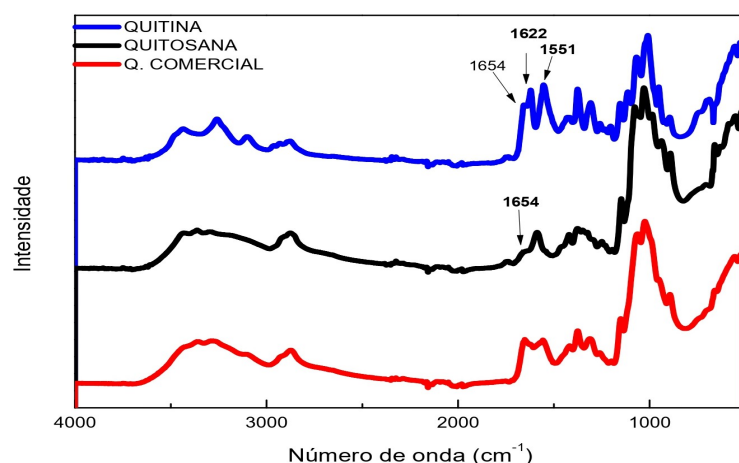


Figura 1: Espectros FTIR da quitina e quitosana obtidas a partir dos resíduos de cutícula do *Zophobas morio* e quitosana comercial.

A Figura 2 apresenta as micrografias das amostras de quitina e quitosana examinadas em aumento de 50x e 500x. A análise das características morfológicas é importante para determinação da aplicação viável da quitina e quitosana ⁽¹⁹⁾.

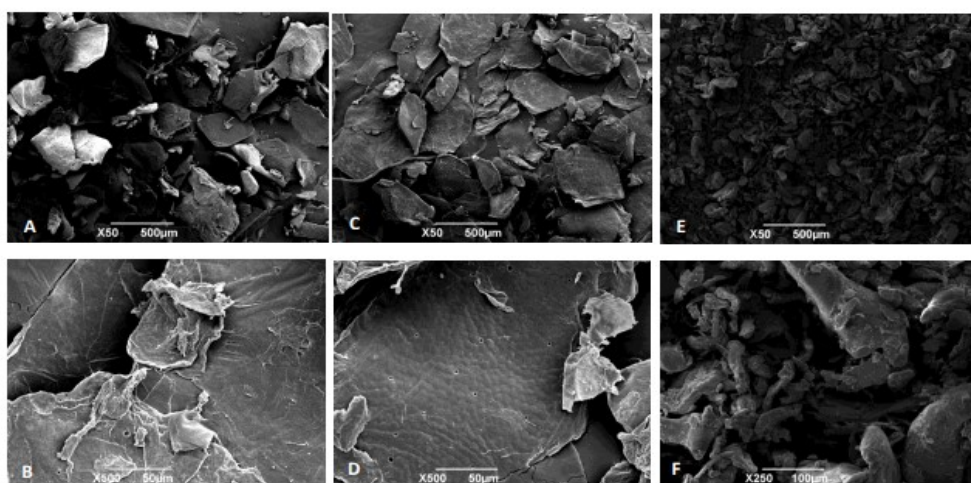


Figura 2: Micrografias de superfície das amostras de quitina e quitosana. A: quitina 50x; B: quitina 500x; C: quitosana 50x; D: quitosana 500x; E: quitosana comercial 50x; F: quitosana comercial 500x.

A quitina apresentou estrutura fibrosa dispostas em partículas de diferentes tamanhos e presença de alguns pequenos poros. A quitosana apresentou estrutura com unidades repetitivas hexagonais similar a favos de mel e presença de pequenos poros, como relatado em estudo anterior ⁽²²⁾. Em comparação com a quitosana comercial, diferenças foram observadas. A quitosana comercial apresentou estrutura fibrosa dispostas em pequenas partículas. A literatura relata que a morfologia da superfície da quitina/quitosana podem apresentar estruturas diferentes dependendo das espécies de insetos e também podem variar na mesma espécie de inseto, conforme gênero e estágio de crescimento ^(2,8,16,21,22). A quitosana foi analisada também quanto ao grau de desacetilação (DD), solubidade e viscosidade aparente. O DD encontrado foi de $83,57\% \pm 0,28$, superior ao da quitosana comercial ($81,46\% \pm 1,20$). Essa é uma das principais características da quitosana e quanto maior o percentual, melhor sua aplicação tecnológica ^(4, 21,22), pois o DD se refere à distribuição de grupos amino ao longo da cadeia polimérica e influência tanto nas propriedades químicas

(solubilidade, flexibilidade, conformação do polímero, resistência à tração, condutividade, fotoluminescência etc.), como nas biológicas (biodegradabilidade, biocompatibilidade, antimicrobiano e antioxidante etc.)^(4, 23, 24). A literatura relata que o DD da quitosana pode variar entre 56-99% com uma média de 80% e depende da fonte de extração, tamanho da partícula de quitina, quantidade de álcali usado, tempo e variações de temperatura durante o processo de extração⁽²⁵⁾. A solubilidade da quitosana obtida da cutícula de inseto (94,00%±2,68), foi similar à da quitosana comercial (94,39%±0,08), indicando o potencial dessa quitosana, pois esta é uma das mais importantes propriedades químicas da quitosana e influencia diretamente na sua aplicação. Para o ensaio reológico, a viscosidade aparente da quitosana foi de 235,87 mPa.s ± 6,16, compatível com a quitosana comercial (249,86 mPa.s ± 0,18), sendo observado um declínio a medida que a taxa de cisalhamento aumentou, demonstrando sua característica de fluido pseudo-plástico (não newtonianos). A avaliação do comportamento reológico permite determinar as condições de processamento em escala industrial da quitosana⁽²¹⁾ e resultado semelhante a este foi relatado em pesquisa anterior⁽⁹⁾.

CONCLUSÕES

Os resultados referentes aos rendimentos e caracterizações físico-químicas da quitina e quitosana obtidas a partir da cutícula residual da larva de *Zophobas morio*, demonstraram potencial como uma fonte renovável e não convencional para obtenção dos referidos biopolímeros, apresentando características satisfatórias para diferentes aplicações.

REFERÊNCIAS

1. KAYA, M.; SEYYAR, O.; BARAN, T.; ERDOĞAN, S.; KAR, M.. A physicochemical characterization of fully acetylated chitin structure isolated from two spider species: With new surface morphology. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 65, p. 553–558, 2014.
2. SOON, C. Y.; TEE, Y. B.; TAN, C. H.; ROSNITA, A. T.; KHALINA, A. Extraction and physicochemical characterization of chitin and chitosan from *Zophobas morio* larvae in varying sodium hydroxide concentration. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 108, p. 135–142, 2018.
3. SINGH, R.; SHITIZ, K.; SINGH, A. Chitin and chitosan: biopolymers for wound management. **International Wound Journal**, vol. 14, no. 6, p. 1276–1289, 2017.
4. PHILIBERT, T.; LEE, B. H.; FABIEN, N. Current Status and New Perspectives on Chitin and Chitosan as Functional Biopolymers. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 181, no. 4, p. 1314–1337, 2017.
5. JANTZEN DA SILVA LUCAS, A.; MENEGON DE OLIVEIRA, L.; DA ROCHA, M.; PRENTICE, C. Edible insects: An alternative of nutritional, functional and bioactive compounds. **Food Chemistry**, vol. 311, p. 126022, 2020.
6. LEUNG, D.; YANG, D.; LI, Z.; ZHAO, Z.; CHEN, J.; ZHU, L. Biodiesel from *Zophobas morio* larva oil: Process optimization and FAME characterization. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, vol. 51, no. 2, p. 1036–1040, 2012.
7. MUSYAROH, M.; HIDAYAT, N. The Effect of Stirring Length Time and NaOH Concentration on the Neutralization Process of Superworm Cooking Oil Purification. **Industria: Jurnal Teknologi dan Manajemen Agroindustri**, vol. 7, no. 2, p. 81–88, 2018.
8. JANTZEN DA SILVA LUCAS, A.; QUADRO O., E.; LEÃO G. C., H.; MARTÍN L., H.; DIAS M. S., C.; PRENTICE, C. Extraction, physicochemical characterization, and morphological properties of chitin and chitosan from cuticles of edible insects. **Food Chemistry**, vol. 343, no. June 2020, 2021.
9. LUO, Q.; WANG, Y.; HAN, Q.; JI, L.; ZHANG, H.; FEI, Z.; WANG, Y.. Comparison of the physicochemical, rheological, and morphologic properties of chitosan from four insects. **Carbohydrate Polymers**, vol. 209, p. 266–275, 2019.

10. DA SILVA, J.A., CARDOSO, L.G., DE JESUS ASSIS, D. Xanthan Gum Production by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* IBSBF 1866 and 1867 from Lignocellulosic Agroindustrial Wastes. **Appl Biochem Biotechnol** **186**, 750–763 (2018).
11. HAJJI, S.; YOUNES, I.; GHORBEL-BELLAAJ, O.; HAJJI, R.; RINAUDO, M.; NASRI, M. Structural differences between chitin and chitosan extracted from three different marine sources. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 65, p. 298–306, 2014.
12. SAGHEER, F. A.A.; AL-SUGHAYER, M. A.; MUSLIM, S.; ELSABEE, M. Z. Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. **Carbohydrate Polymers**, vol. 77, no. 2, p. 410–419, 2009.
13. YOUNES, I.; GHORBEL-BELLAAJ, O.; NASRI, R.; CHAABOUNI, M.; RINAUDO, M.; NASRI, M. Chitin and chitosan preparation from shrimp shells using optimized enzymatic deproteinization. **Process Biochemistry**, vol. 47, no. 12, p. 2032–2039, 2012.
14. CALIGIANI, A.; MARSEGLIA, A.; LENI, G.; BALDASSARRE, S.; MAISTRELLO, L.; DOSSENA, A.; SFORZA, S. Composition of black soldier fly prepupae and systematic approaches for extraction and fractionation of proteins, lipids and chitin. **Food Research International**, vol. 105, no. December 2017, p. 812–820, 2018.
15. KAYA, M.; BARAN, T.; ASAN-OZUSAGLAM, M.; CAKMAK, Y. S.; TOZAK, K. O.; MOL, A.; MENTES, A.; SEZEN, G. Extraction and characterization of chitin and chitosan with antimicrobial and antioxidant activities from cosmopolitan Orthoptera species (Insecta). **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, vol. 20, no. 1, p. 168–179, 2015.
16. ZELENKOVA, L.; ERDOĞAN, S.; BARAN, T.; KAYA, M. Chitin extraction and chitosan production from Chilopoda (*Scolopendra cingulata*) with identification of physicochemical properties. **Polymer Science - Series A**, vol. 57, no. 4, p. 437–444, 2015.
17. MAHDY SAMAR, M.; EL-KALYOUNI, M. H.; KHALAF, M. M.; ABD EL-RAZIK, M. M. Physicochemical, functional, antioxidant and antibacterial properties of chitosan extracted from shrimp wastes by microwave technique. **Annals of Agricultural Sciences**, vol. 58, no. 1, p. 33–41, 2013.
18. MITTAL, A.; SINGH, A.; ALUKO, R. E.; BENJAKUL, S. Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) shell chitosan and the conjugate with epigallocatechin gallate: Antioxidative and antimicrobial activities. **Journal of Food Biochemistry**, vol. 45, no. 1, p. 1–16, 2021.
19. PAULINO, A. T.; SIMIONATO, J. I.; GARCIA, J. C.; N., J. Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm crysalides. **Carbohydrate Polymers**, vol. 64, no. 1, p. 98–103, 2006.
20. SHIN, C. S.; KIM, D. Y.; SHIN, W. S. Characterization of chitosan extracted from Mealworm Beetle (*Tenebrio molitor*, *Zophobas morio*) and Rhinoceros Beetle (*Allomyrina dichotoma*) and their antibacterial activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 125, p. 72–77, 2019.
21. SAENZ-MENDOZA, A. I.; ZAMUDIO-FLORES, P. B.; GARCÍA-ANAYA, M. C.; VELASCO, C. R.; ACOSTA-MUÑOZ, C. H.; DE JESÚS ORNELAS-PAZ, J.; HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M.; VARGAS-TORRES, A. Characterization of insect chitosan films from *Tenebrio molitor* and *Brachystola magna* and its comparison with commercial chitosan of different molecular weights. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 160, p. 953–963, 2020.
22. WAŚKO, A.; BULAK, P.; POLAK-BERECKA, M.; NOWAK, K.; POLAKOWSKI, C.; BIEGANOWSKI, A. The first report of the physicochemical structure of chitin isolated from *Hermetia illucens*. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 92, 2016.
23. MATICA, M. A.; AACHMANN, F. L.; TØNDERVIK, A.; SLETTA, H.; OSTAFE, V. Chitosan as a wound dressing starting material: Antimicrobial properties and mode of action. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 20, no. 23, p. 1–34, 2019.
24. SANTOS, G. C. L.; OLIVEIRA, J. S. de; NETO, S. G.; DUARTE, A. M. C. Uma revisão de quitosana: polímero que melhora a eficiência do rebanho e a sustentabilidade do sistema de produção A. **Brazilian Journal of Animal and Environment Research**, , p. 168–178, 2018.
25. MULEY, A. B.; CHAUDHARI, S. A.; MULCHANDANI, K. H.; SINGHAL, R. S. Extraction and characterization of chitosan from prawn shell waste and its conjugation with cutinase for enhanced thermo-stability. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 111, no. 2017, p. 1047–1058, 2018.