



USO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA NA ETAPA DE DESPROTEINIZAÇÃO PARA OBTENÇÃO DE QUITOSANA A PARTIR DE EXOESQUELETO DE TENEBRIO COMUM (*Tenebrio molitor*) PROVENIENTE DA ECDISE DO INSETO

A.J.S. Lucas¹, H.L.G. Costa², H.M. López³, C.D.M. Saad⁴, M. Paula⁵, C. Prentice⁶

1- Escola de Química e Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande – CEP: 96203-900 – Rio Grande – RS – Brasil, Telefone: 55 (53) 3233-6500 – e-mail: (1-andressajantzen@yahoo.com.br; 2- gouveia.helena@hotmail.com; 4- csaad97@gamil.com; 5- marianedipaula@hotmail.com; 6- dqmprent@furg.br)

3- Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco - Parque Científico Tecnológico de Yucatán - Mérida Yucatán – México, Telefone: 52 999-341-0038 – e-mail: (hemartin_al@ciatej.edu.mx)

RESUMO – A quitina é encontrada como elemento de suporte nos exoesqueletos de insetos. O derivado mais importante da quitina é a quitosana, obtida por desacetilação parcial da quitina. Logo, o objetivo do presente estudo foi avaliar o uso da hidrólise enzimática na etapa de desproteínização para obtenção de quitosana a partir de exoesqueleto de *Tenebrio molitor*. Os exoesqueletos foram secos, moídos e peneirados. A etapa de desproteínização foi realizada na proporção de 3% (proteína/ água). A enzima utilizada foi Alcalase. A fração insolúvel proveniente da hidrólise foi seca, moída e embalada. Foram realizadas análises do teor de proteínas antes e depois da desproteínização. O grau máximo de hidrólise (10,74%) foi obtido em 230 min de reação. O teor proteico da amostra antes e depois da hidrólise enzimática foi de 38,08% e 8,76%, respectivamente, mostrando a eficácia do uso de enzimas proteolíticas na etapa de desproteínização para obtenção de quitosana.

ABSTRACT – Chitin is found as a support element in insect exoskeletons. The most important derivative of chitin is chitosan, obtained by partial deacetylation of chitin. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the use of enzymatic hydrolysis in the deproteinization stage to obtain chitosan from *Tenebrio molitor* exoskeleton. The exoskeletons were dried, ground and sieved. The deproteinization step was carried out in the proportion of 3% (protein / water). The enzyme used was alcalase. The insoluble fraction from hydrolysis was dried, ground and packaged. Protein content analyzes were performed before and after deproteinization. The maximum degree of hydrolysis (10.74%) was obtained in 230 min of reaction. The protein content of the sample before and after enzymatic hydrolysis was 38.08% and 8.76%, respectively, showing the effectiveness of using proteolytic enzymes in the deproteinization step to obtain chitosan.

PALAVRAS-CHAVE: alcalase; ecdise; insetos.

KEYWORDS: alcalase; ecdysis; insects.

1. INTRODUÇÃO

Coleoptera é provavelmente a maior ordem de insetos, com cerca de 350.000 espécies descritas em quatro subordens (Archostemata, Myxophaga, Adepaga e o maior grupo, Polyphaga). O *Tenebrio molitor* é um coleóptero da família tenebrionidae (Gullan e Cranson, 2005). Nos insetos, assim como no *Tenitor molitor*, o crescimento e o desenvolvimento requerem a produção periódica de um novo exoesqueleto cuticular. Os insetos passam por estágios sucessivos de alimentação e muda. Cada muda é denominada ecdise, comportamento este

27 A 29 DE OUTUBRO DE 2020



ON LINE

7º Simpósio de
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

controlado por hormônios peptídicos e vital para os insetos, uma vez que eles perdem a cutícula antiga para emergir como o estágio de desenvolvimento seguinte (Zitnan e Adams, 2012; Wulff et al., 2018).

A cutícula do inseto é um biocomposito natural com propriedades físico-químicas únicas. É a parte mais externa dos cobrindo todo o corpo, além de revestir invaginações ectodérmicas, como o antebráço, o intestino posterior e o sistema traqueal. A cutícula do inseto contém quitina na faixa de 20 a 50% do seu peso seco (Chapman, 2013). Este, é o segundo polissacarídeo mais comum no mundo após a celulose (Wang et al., 2017). O derivado mais importante da quitina é a quitosana, podendo ser obtida por desacetilação parcial da quitina em condições alcalinas. A quitosana consiste em amino polissacarídeo linear com unidades de D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina (El Knidri et al., 2017). A quitosana é mais útil em termos de função do que em aspectos nutricionais para melhorar a saúde. Este polissacarídeo tem sido efetivamente utilizado em diversas áreas, como indústria farmacêutica, aplicações ambientais, especialmente em água, papel, tratamento têxtil, para atividade antimicrobiana, aplicações biomédicas, tratamento da obesidade, prevenção de doenças vasculares e aplicações industriais de alimentos, como filmes de embalagem, nanocápsulas e nanopartículas, a quitosana também é um dos adsorventes mais baratos usados na remoção de metais pesados das águas residuais (Bakshia et al., 2019).

O processo de extração da quitosana envolve três etapas principais, como desmineralização, desproteíntização e desacetilação (Srinivasan et al., 2017). Normalmente, a quitina e a quitosana são obtidas por métodos químicos que envolvem o uso de ácidos e bases fortes para dissolver carbonatos de cálcio e proteínas (El Knidri et al., 2018). Condições de reações mais severas em termos de concentração e temperatura de álcalis resultam em quitosana mais desacetilada, mas prolongar a reação também provoca despolimerização severa e perda de algumas propriedades do polímero (Delezuk et al., 2011). Portanto, diferentes vias estão sendo propostas para melhorar as reações que envolvem todo o processo de obtenção de quitosana. Logo, o presente estudo teve como objetivo avaliar o uso da hidrólise enzimática na etapa de desproteíntização para obtenção de quitosana a partir de exoesqueleto de tenébrio comum (*Tenebrio molitor*) proveniente da ecdise do inseto.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Materiais

Os exoesqueletos de *Tenebrio comum* foram doados por Insetos Kaissara (Paraíba - Brasil). Este criadouro é certificado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil. A enzima utilizada para a desproteíntização das amostras foi a Alcalase 2.4L, uma endopeptidase bacteriana produzida a partir da fermentação submersa de *Bacillus licheniformis*, fornecida pela Novozymes Latin America (Araucária - Brasil). Os reagentes utilizados no presente estudo foram de grau analítico (P.A.).

2.2 Métodos

Para realizar a etapa de desproteíntização primeiramente foi feito um pré-tratamento da amostra, a fim de torná-la mais homogênea. Logo após foi realizada desproteíntização da amostra utilizando hidrólise enzimática. As amostras foram avaliadas em relação ao teor protéico antes e depois da hidrólise, conforme metodologia a seguir:

Pré-tratamento: Os exoesqueletos de tenébrio comum foram secos em um secador de bandeja de aço inoxidável tradicional (0,16 m x 0,16 m) (FANEM 520, Brasil), com 0,005 m de espessura a 60 °C *overnight*.

Os exoesqueletos secos foram moídos em um moinho de facas (MARCONI Wiley Mill Standard n° 03, EUA) e depois peneirados para obter um pó com tamanho de partícula padrão (Tyler 42), conforme descrito por Antunes-Valcareggi et al. (2017). A amostra foi embalada em recipientes de plástico e armazenada em temperatura ambiente até o uso.

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br



A etapa de desproteínização foi realizada de acordo com metodologia proposta por [Hall et al. \(2017\)](#) com modificações. As cutículas de *Tenebrio molitor* foram homogeneizadas em água destilada na proporção de 3% (proteína/ água) em um reator de vidro revestido acoplado a um banho ultra-termoestático (Quimis, Q212S, Brasil), sob agitação constante (Fisatom, Brasil) a 500 rpm. A enzima proteolítica utilizada foi a alcalase, a temperatura do banho foi ajustada para 55 °C bem como o pH foi ajustado para 8.0 utilizando solução de hidróxido de sódio 1M. Ambos os ajustes foram realizados antes de se iniciar a reação a fim de proporcionar um parâmetro de desempenho ideal para a enzima. A hidrólise enzimática começou adicionando a enzima na proporção de 2% enzima/ substrato. O grau de hidrólise (GH) foi monitorado a cada 10 minutos até se tornar constante, de acordo com [Adler-Nissen \(1986\)](#). Ao final da reação, a enzima foi inativada em banho-maria a 90 °C por 15 min. O produto resultante do processo foi centrifugado a 9000 × g por 20 min a 4 °C (Hanil Supra 22K, Índia), para separar as frações solúvel (hidrolisado protéico) e insolúvel (quitina e minerais). A fração insolúvel foi seca em estufa de circulação de ar (Fanem 520, Brasil) a 50 °C *overnight*, moída em moinho de facas (Marconi Wiley Mill Standard nº 03, EUA), acondicionada em recipientes de plástico e armazenada em temperatura ambiente até o uso. O GH da reação foi monitorado de acordo com a Equação 1:

$$GH: (h/h_{tot}) \times 100 \quad (1)$$

Onde GH é o grau de hidrólise expresso em %, h é o número de ligações peptídicas hidrolisadas e h_{tot} é o número de ligações peptídicas totais da proteína antes da reação.

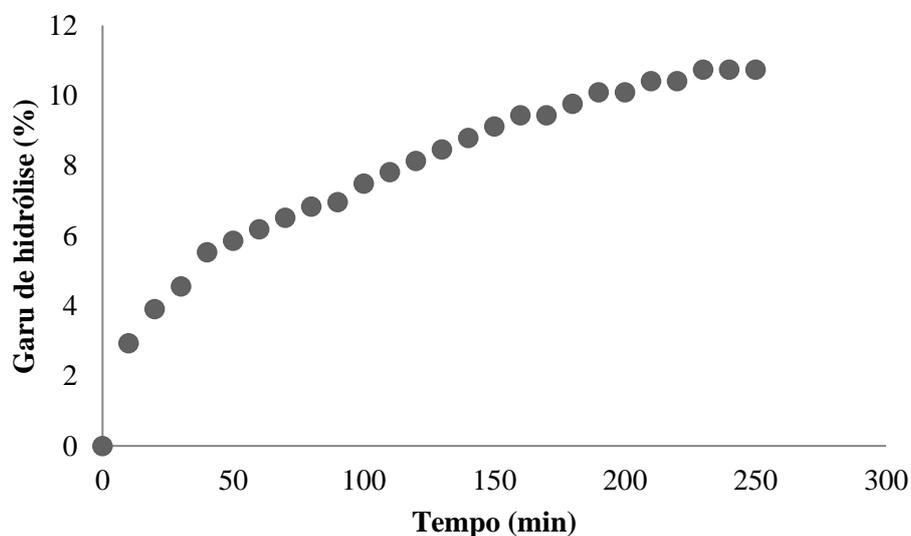
Teor de proteínas: Os exoesqueletos de tenébrio comum foram avaliados quanto ao teor de proteína (método micro-Kjedahl, nº 920.87) antes e depois da etapa de desproteínização segundo o método descrito por [AOAC \(2019\)](#). O fator de conversão utilizado para a proteína foi de 5,6, de acordo com [Janssen et al. \(2017\)](#).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso de enzimas para conversão de diferentes subprodutos em produtos de alto valor agregado já é amplamente difundido ([Latorres et al., 2018](#); [Da Rocha et al., 2018](#); [De Quadros et al., 2018](#)). Porém, não são encontrados na literatura estudos utilizando enzimas na etapa de desproteínização para obtenção de quitosana proveniente de subprodutos de insetos. A enzima Alcalase tem sido empregada para remover as proteínas intimamente ligadas à quitina e aos minerais ([Lopes et al., 2018](#); [Vázquez et al., 2017](#)), bem como tem sido utilizada no estudo de hidrolisados proteicos a base de insetos, como por exemplo: *Bombyx mori*, *Bombus terrestris*, *Schistocerca gregaria*, *Grylloides sigillatus* e *Spodoptera littoralis* ([Lucas et al., 2019](#)). Esta enzima atividade ótima em uma faixa de pH 6,5 a 8,5, temperatura de 50 a 70 °C e apresentam baixa especificidade de substrato ([Yust et al., 2010](#)). A ação catalítica das enzimas permite que as ligações peptídicas se clivem durante a reação, que pode ser monitorada pelo grau de hidrólise (razão percentual entre o número de ligações peptídicas clivadas e o número total de ligações peptídicas no substrato estudado) ([de Castro & Sato, 2014](#)).

O Grau de hidrólise (GH) das proteínas hidrolisadas pelas enzimas determina as propriedades funcionais e biológicas das mesmas, é um critério quantitativo para medir o progresso da degradação hidrolítica das proteínas. As proteínas quando intactas possuem um valor de GH de 0% e completamente hidrolisadas têm valor de GH de 100% ([Lee, 2015](#)). A Figura 1 apresenta a cinética de hidrólise para a etapa de desproteínização dos exoesqueletos. De acordo com os dados, pode-se observar que em 230 min de reação o grau de hidrólise começou a manter-se constante, a reação foi inativada em 250 min com grau de hidrólise máximo de 10,74%. No início da reação ocorreu a hidrólise de maior quantidade de ligações peptídicas e, após determinado período, essa quantidade reduziu até apresentar comportamento constante. Essa diminuição na taxa de reação pode ser explicada pela redução de substrato disponível ou pela inibição da atividade enzimática ([Kristinsson e Rasco, 2000](#)).

Figura 1- Cinética da hidrólise para a etapa de desproteïnização do exoesqueleto de tenébrio comum (*Tenebrio molitor*)



Ao analisar o teor proteico da amostra antes e depois da hidrólise enzimática pode-se observar uma diminuição significativa do mesmo. A amostra inicial apresentou 38,08% de proteína, já a amostra após hidrólise apresentou um teor proteico de 8,76% (redução de 85%). A eficácia do uso de hidrólise enzimática na remoção de proteínas pode ser observada no estudo de [Younes et al. \(2012\)](#). Os autores utilizaram um planejamento experimental com três variáveis e três níveis para a determinar a eficiência da desproteïnização de carapaças de camarão com tratamento enzimático utilizando *B. mojavensis* A21 protease. Ao final do estudo pode-se verificar que a protease removeu até 88 % dos as proteínas da carapaça de acordo com a otimização realizada. As condições ideais para desproteïnização foram: uma relação enzima/ substrato de 7,75 U/ mg, uma temperatura de 60 °C e um tempo de hidrólise de 6 h. O mesmo valor de remoção de proteína (88%) foi obtido por [Manni et al. \(2009\)](#). Neste estudo, o processo de desproteïnização enzimática foi aplicado usando uma protease bruta de *B. cereus* SV1 e verificou-se que a protease desproteïnizou até 88% da carapaça de camarão em comparação a desproteïnização química 92,6 %, porém os autores justificam o uso de enzimas como forma de redução do uso de ácidos e bases fortes. Os resultados obtidos demonstraram que o uso de hidrólise enzimática na desproteïnização de subprodutos de insetos para obtenção de quitosana é viável, porém, mais estudos nesta área devem surgir como forma de melhorar o processo.

4. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que a utilização de enzimas proteolíticas na etapa de desproteïnização a fim de se obter quitosana foi eficaz uma vez que reduziu o teor proteico da amostra em 85%.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) do Brasil [número de concessão 001]. Bem como, agradecem a Insetos Kaissara pela doação da matéria prima utilizada e a Novozymes Latin America pela doação da enzima utilizada.



6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymatic hydrolysis of food proteins* (1. ed.). Londres: Elsevier Applied Science Publishing.
- Antunes-Valcareggi, S. A., Ferreira, S. R. S., & Hense, H. (2017). Enzymatic hydrolysis of Blue Crab (*Callinectes Sapidus*) waste processing to obtain chitin, protein, and astaxanthin enriched extract. *International Journal of Environmental & Agriculture Research*, 3, 81-92.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemistry. (2019). *Official Methods of analysis* (21. ed.). Washington: Pharmabooks.
- Bakshia, P. S., Selvakumara, D., Kadirvelub, K., & Kumara, N. S. (2019). Chitosan as an environment-friendly biomaterial – a review on recent modifications and applications, *International Journal of Biological Macromolecules* DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.113>
- Chapman, R. F. (2013). *The insects: structure and function* (5. ed.). Cambridge: Cambridge University Press.
- Da Rocha, M., Alemán, A., Baccan, G. C., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, C., Montero, P., & Prentice, C. (2018). Anti-Inflammatory, antioxidant, and antimicrobial effects of underutilized fish protein hydrolysate. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 27(5), 592–608.
- De Castro, R. J. S., & Sato, H. H. (2014). Advantages of an acid protease from *Aspergillus oryzae* over commercial preparations for production of whey protein hydrolysates with antioxidant activities. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3, 58–65
- Delezuk, J. A. M., Cardoso, M. B., Domard, A., & Campana-Filho, S. P. (2011). Ultrasound-assisted deacetylation of beta-chitin: influence of processing parameters. *Polymer International*, 60(6), 903–909.
- El Knidri, H., Belaabed, R., El khalfaouy, E., Laajeb, A., Addaou, A., & Lahsini, A. (2017). Physicochemical characterization of chitin and chitosan produced from *Parapenaeus Longirostris* shrimp shell wastes, *Journal of Materials and Environmental Science*, 8(10), 3648–3653.
- El Knidri, H., Belaabed, R., Addaou, A., Laajeb, A., & Lahsini, A. (2018). Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosan: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, 1181-1189.
- Gullan, P. J., & Cranston, P. S. (2005). *The insects – an outline of entomology* (4. ed.). Hong Kong: Graphicraft Limited.
- Hall, F. G., Jones, O. G., O’Haire, M. E., & Liceaga, A. M. (2017). Functional properties of tropical banded cricket (*Gryllobates sigillatus*) protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 224, 414–422.
- Janssen, R. H., Vincken, J.-P., van den Broek, L. A. M., Fogliano, V., & Lakemond, C. M. M. (2017). Nitrogen-to-Protein Conversion Factors for Three Edible Insects: *Tenebrio molitor*, *Alphitobius diaperinus*, and *Hermetia illucens*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(11), 2275–2278.
- kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000). Fish protein hydrolysates: Production, biochemical and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(1), 43–81.
- Latorres, J. M., Rios, D. G., Saggiomo, G., Wasielesky, W. Jr., Prentice, C. (2018). Functional and antioxidant properties of protein hydrolysates obtained from White shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Food Science and Technology*, 55(2), 721-729.
- Lee, C. (2014). *Ciência e Tecnologia de Alimentos* (1. ed.). São Paulo: Manole.
- Lopes, C., Antelo, L. T., Franco-Uría, A., Alonso, A. A., & Pérez-Martín, R. (2018). Chitin production from crustacean biomass: Sustainability assessment of chemical and enzymatic processes. *Journal of Cleaner Production*, 172, 4140-4151.
- Lucas, A. J. S., Oliveira, L. M., Da Rocha, M., & Prentice, C. (2019). Edible insects: an alternative of nutritional, functional and bioactive compounds. *Food Chemistry*, 126022. doi:10.1016/j.foodchem.2019.126022
- Manni, L., Ghorbel-Bellaaj, O., Jellouli, K., Younes, I., & Nasri, M. (2009). Extraction and characterization of chitin, chitosan, and protein hydrolysates prepared from shrimp waste by treatment with crude protease from *Bacillus cereus* SV1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(2), 345–357.

27 A 29 DE OUTUBRO DE 2020



ON LINE

7º Simpósio de
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

- Quadros, C. D. C., Lima, K. O., Bueno, C. H. L., Fogaça, F. D. S., Da Rocha, M., & Prentice, C. (2019). Evaluation of the antioxidant and antimicrobial activity of protein hydrolysates and peptide fractions derived from *colossoma macropomum* and their effect on ground beef lipid oxidation. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 28(6), 1–12.
- Srinivasan, H., Velayutham, K., & Ravichandran, R. (2017). Chitin and chitosan preparation from shrimp shells *Penaeus monodon* and its human ovarian cancer cell line, PA-1, *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 662-667.
- Vázquez, J. A., Noriega, D., Ramos, P., Valcarcel, J., Novoa-Carballal, R., Pastran, L., Reis, R. L., & Pérez-Martín, R. I. (2017). Optimization of high purity chitin and chitosan production from *Illex argentinus pens* by a combination of enzymatic and chemical processes. *Carbohydrate Polymers*, 174, 262-272.
- Wang, H., Qian, J., & Ding, F. (2017). Emerging chitosan-based films for food packaging applications. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 66(2), 395–413.
- Wulff, J. P., Capriotti, N., & Ons, S. (2018). Orcokinin regulate the expression of neuropeptide precursor genes related to ecdysis in the hemimetabolous insect *Rhodnius prolixus*. *Journal of Insect Physiology*, 108, 31–39.
- Younes, I., Ghorbel-Bellaaj, O., Nasri, R., Chaabouni, M., Rinaudo, M., & Nasri, M. (2012). Chitin and chitosan preparation from shrimp shells using optimized enzymatic deproteinization. *Process Biochemistry*, 47(12), 2032–2039.
- Yust, M. D. M., Pedroche, J., Del Carmen Millán-Linares, M., Alcaidehidalgo, J. M., Millán, F. (2010). Improvement of functional properties of chickpea proteins by hydrolysis with immobilized Alcalase. *Food Chemistry*, 122(4), 1212–1217.
- Zitnan, D., & Adams, M. E. (2012). *Insect Endocrinology* (1. ed.). Londres: ElsevierApplied Science Publishing

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br