



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA**

**CARACTERIZAÇÃO DE QUITINA E QUITOSANA EXTRAÍDA DE *Gryllus assimilis* E *Zophobas morio* E SUA AÇÃO ANTIBACTERIANA *in vitro* SOBRE *Vibrio parahaemolyticus*, *Streptococcus agalactiae* e *Aeromonas hydrophila***

**Larissa de Souza Dornelas de Mattos Carvalho**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco como exigência para obtenção do título de Mestre.

**Prof.(a) Dr.(a) SUZIANNY  
MARIA BEZERRA CABRAL DA  
SILVA**  
Orientadora

**Recife,  
Fev/2026**

## Ficha catalográfica

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Bibliotecária Suely Manzi – CRB/4 809

C331c Carvalho, Larissa de Souza Dornelas de Mattos  
Caracterização de quitina e quitosana extraída de *Gryllus assimilis* e *Zophobas moria* e sua ação antibacteriana *in vitro* sobre *Vibrio parahaemolyticus*, *Streptococcus agalactiae* e *Aeromonas hydrophila* / Larissa de Souza Dornelas de Mattos Carvalho. – 2026.

30 f.

Orientadora: Suzianny Maria Bezerra Cabral da Silva.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura, Recife, BR-PE, 2026.

Inclui referências.

1. Quitina 2. Quitosana 3. Insetos 4. Bactericida 5. Aquicultura  
I. Silva, Suzianny Maria Bezerra Cabral da, orient. II. Título

CDD 639.8

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA**

**CARACTERIZAÇÃO DE QUITINA E QUITOSANA EXTRAÍDA DE *Gryllus assimilis* E *Zophobas morio* E SUA AÇÃO ANTIBACTERIANA *in vitro* SOBRE *Vibrio parahaemolyticus*, *Streptococcus agalactiae* e *Aeromonas hydrophila***

**Larissa de Souza Dornelas de Mattos Carvalho**

Dissertação julgada adequada para obtenção do título de mestre em Recursos Pesqueiros e Aquicultura. Defendida e aprovada em 26/02/2026 pela seguinte Banca Examinadora.

**Profa. Dra. Suzianny Maria Bezerra Cabral da Silva**

Orientadora  
DEPAq/UFRPE

**Prof. Dr. Ranilson Souza Bezerra**

Membro Interno  
DBioq/UFPE

**Prof. Dr. Marcos Antônio Barbosa de Lima**

Membro Externo  
DB/UFRPE

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho a minha família, aos meus amigos e aos meus animais de estimação.

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me concedido saúde, força e perseverança para concluir mais esta etapa da minha vida acadêmica.

Ao meu marido, Icaro, e ao meu amado filho, Benjamin, meu mais sincero agradecimento. Obrigada por serem meu porto seguro, pela paciência nos momentos de minha ausência, pelo incentivo nos dias difíceis e pelo amor incondicional que sustentou toda a minha caminhada. Sem o apoio de vocês, nada disso faria sentido.

À minha orientadora, Profa. Dra. Suzianny Maria Bezerra Cabral da Silva, pela oportunidade, pela confiança depositada em meu trabalho e pela orientação segura ao longo deste mestrado. Agradeço pelos ensinamentos que foram muito além da academia.

Aos meus pais, Vera e Nivaldo, e à minha irmã, Leticia, que sempre acreditaram no meu potencial e me incentivaram a buscar o conhecimento.

Aos colegas e amigos de laboratório, em especial ao meu “estagiário preferido”, Vinícius, pela parceria diária na busca pela quitosana perfeita. Aos demais, agradeço pela colaboração nas bancadas, pelas trocas de conhecimento e pelos cafezinhos que tornaram o ambiente de trabalho mais leve e acolhedor.

Ao Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra e à doutoranda Maria Angélica, do Laboratório de Enzimologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), agradeço pelo apoio nos primeiros passos deste projeto e pelas valiosas orientações que contribuíram para o direcionamento correto da pesquisa.

À Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da UFPE, pelo suporte técnico nas análises de FTIR.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura, pela formação acadêmica de excelência.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro indispensável à realização desta pesquisa.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a concretização deste trabalho, o meu mais sincero agradecimento.

## Resumo

A intensificação da aquicultura tem favorecido a ocorrência de bacterioses, impulsionando o uso recorrente de antibióticos e contribuindo para o desenvolvimento de resistência antimicrobiana. Nesse contexto, a quitina e a quitosana obtidas de insetos comestíveis emergem como alternativas naturais e sustentáveis com potencial aplicação sanitária. O presente estudo teve como objetivo extrair, caracterizar e avaliar a atividade antibacteriana da quitina e da quitosana obtidas de *Gryllus assimilis* e *Zophobas morio*. Foram comparadas três metodologias: Extração Química, Extração Química-Biológica e Extração Química Assistida por Enzima. As quitosanas obtidas foram caracterizadas quanto à solubilidade, espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) e grau de desacetilação (DD). A atividade antibacteriana foi avaliada *in vitro* por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente a *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Streptococcus agalactiae*. Os resultados evidenciaram que a matriz biológica do inseto e a metodologia de extração influenciam diretamente a qualidade do polímero obtido. A matriz de *G. assimilis* demonstrou eficácia excepcional e generalizada, com valores de CIM variando de 0,031 a 0,250 mg/mL. A rota enzimática destacou-se pelo melhor desempenho global para esta espécie, unindo elevado DD (78,01%) e altíssima atividade antibacteriana. Em contraste, a elevada fração lipídica da matriz larval de *Z. morio* limitou a eficiência da Extração Química convencional (DD = 67,93%), resultando em bioatividade severamente reduzida (CIM de até 4 mg/mL). Contudo, a aplicação de rotas biotecnológicas (Extração Química-Biológica e Química Assistida por Enzima) elevou o DD de *Z. morio* para valores próximos a 75% e promoveu uma expressiva recuperação da atividade antimicrobiana, reduzindo a CIM para até 0,031 mg/mL. Concluiu-se que metodologias assistidas por microrganismos e enzimas são essenciais para superar barreiras estruturais da matriz e favorecem a obtenção de quitosanas com grau de desacetilação equiparável aos padrões comerciais. Ademais, destaca-se o ineditismo e a superioridade funcional do grilo *G. assimilis*, reforçando o enorme potencial de biopolímeros derivados de insetos como alternativas sustentáveis aos antibióticos na aquicultura.

**Palavras-chave:** Quitina; Quitosana; Insetos; Atividade antibacteriana; Aquicultura.

## Abstract

The intensification of aquaculture has promoted the occurrence of bacterial diseases, leading to the recurrent use of antibiotics and contributing to the development of antimicrobial resistance. In this context, chitin and chitosan derived from edible insects emerge as natural and sustainable alternatives with potential sanitary applications. The present study aimed to extract, characterize, and evaluate the antibacterial activity of chitin and chitosan obtained from *Gryllus assimilis* and *Zophobas morio*. Three methodologies were compared: Chemical Extraction, Chemical-Biological Extraction, and Enzyme-Assisted Chemical Extraction. The obtained chitosans were characterized in terms of solubility, Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR), and degree of deacetylation (DD). Antibacterial activity was evaluated in vitro by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) against *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Streptococcus agalactiae*. The results demonstrated that the insect biological matrix and the extraction methodology directly influence the quality of the obtained polymer. The *G. assimilis* matrix demonstrated exceptional and generalized efficacy, with MIC values ranging from 0.031 to 0.250 mg/mL. The enzymatic route stood out for the best overall performance for this species, combining a high DD (78.01%) and very high antibacterial activity. In contrast, the high lipid fraction of the *Z. morio* larval matrix limited the efficiency of conventional Chemical Extraction (DD = 67.93%), resulting in severely reduced bioactivity (MIC up to 4 mg/mL). However, the application of biotechnological routes (Chemical-Biological and Enzyme-Assisted Chemical Extractions) increased the DD of *Z. morio* to values close to 75% and promoted a significant recovery of antimicrobial activity, reducing the MIC to as low as 0.031 mg/mL. It is concluded that microorganism- and enzyme-assisted methodologies are essential to overcome the structural barriers of the matrix and favor the obtainment of chitosans with a degree of deacetylation comparable to commercial standards. Furthermore, the novelty and functional superiority of the *G. assimilis* cricket are highlighted, reinforcing the enormous potential of insect-derived biopolymers as sustainable alternatives to antibiotics in aquaculture.

**Keywords:** Chitin; Chitosan; Edible insects; Antibacterial activity; Aquaculture.

## Lista de figuras

Página

Figura 1- Espectros de FTIR de quitina e quitosana extraídas de *Gryllus assimilis* (coluna esquerda) e *Zophobas morio* (coluna direita) utilizando três metodologias distintas. (A, B) Método I: Extração Química; (C, D) Método II: Extração Química-Biológica e; (E, F) Método III: Extração Assistida por Enzima. As linhas verticais indicam as principais bandas características: estiramento O–H/N–H ( $3450\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ ), estiramento C–H ( $2880\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$ ), Amida I ( $\approx 1650\text{--}1620\text{ cm}^{-1}$ ), Amida II ( $\approx 1560\text{--}1540\text{ cm}^{-1}$ ) e ligação  $\beta$ -glicosídica (C–O–C,  $\sim 1150\text{--}1020\text{ cm}^{-1}$ ). As réplicas ( $n = 5$ ) são apresentadas de forma empilhada para demonstrar a reprodutibilidade do processo.

**Lista de tabelas**

	Página
Tabela 1- Rendimentos de quitina e quitosana, solubilidade e grau de desacetilação (DD) obtidos a partir de <i>Gryllus assimilis</i> e <i>Zophobas morio</i> submetidos a diferentes metodologias de extração.	18
Tabela 2- Comparativo do rendimento de quitina e quitosana de diferentes matrizes biológicas reportadas na literatura em relação aos resultados obtidos neste estudo.	20
Tabela 3- Atividade antimicrobiana (CIM, mg/mL) das quitosanas de <i>Gryllus assimilis</i> e <i>Zophobas morio</i> obtidas por diferentes metodologias de extração frente a bactérias patogênicas.	24

## Sumário

	Página
Resumo	06
Abstract	07
Lista de figuras	08
Lista de tabelas	09
1- Introdução	11
2 - Objetivos	12
Referências	13
3- Artigo Científico	16
3- Considerações finais	30

## 1- Introdução

A aquicultura é o setor de produção de alimentos de origem animal que apresentou o maior crescimento em escala global. De acordo com o mais recente relatório da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2024), a produção global de aquicultura atingiu 130,9 milhões de toneladas em 2022, avaliada em USD 312,8 bilhões; e, pela primeira vez na história, a aquicultura superou a captura, representando 51% da produção total de animais aquáticos. O Brasil destaca-se ainda no cenário global como o 8º maior produtor de aquicultura continental (*inland aquaculture*), com 616 mil toneladas produzidas (FAO, 2024), reafirmando seu potencial estratégico para o setor.

O rápido crescimento e expansão da aquicultura trouxeram diversos desafios, incluindo o surgimento de várias doenças. A intensificação dos sistemas de cultivo expõe os animais a altas densidades e condições de estresse, o que facilita a disseminação de patógenos no ambiente produtivo (RIBEIRO *et al.*, 2014). As bacterioses têm sido um grande obstáculo na aquicultura nas últimas décadas e, dentre os patógenos de maior impacto, destacam-se o *Vibrio parahaemolyticus*, causador de vibrioses severas em peixes e crustáceos marinhos (HEGDE *et al.*, 2023); a *Aeromonas hydrophila*, agente predominante de septicemias em peixes de água doce (ABDELLA *et al.*, 2024); e o *Streptococcus agalactiae*, considerado o principal risco sanitário na tilapicultura intensiva, especialmente no Brasil (RIVAS *et al.*, 2023).

Historicamente, o controle dessas infecções baseou-se no uso de antibióticos, uma prática que, quando indiscriminada, impulsiona a resistência antimicrobiana e resulta na bioacumulação de resíduos na cadeia alimentar e no ambiente aquático, conforme alertam Okeke *et al.* (2022). Para mitigar esses riscos, Treiber e Beranek-Knauer (2021) defendem a necessidade de limitar o uso de antimicrobianos sintéticos e promover alternativas sustentáveis que garantam a segurança alimentar.

Nesse sentido, a busca por estratégias inovadoras, como a gestão sanitária eficaz e a melhoria das dietas, é crucial para mitigar esses riscos (BARRETO *et al.*, 2023). Islam *et al.* (2024) propõem uma abordagem de suplementação alimentar com diversos componentes que promovam ação antimicrobiana, como alternativa ao uso indiscriminado de antibióticos, melhora no desempenho zootécnico e resposta imune, auxiliando no tratamento de doenças. Nessa perspectiva, Guarnieri *et al.* (2022) relatam a busca por novas moléculas naturais, especialmente biopolímeros com potencial antimicrobiano. Dessa forma, a quitina e a quitosana emergem como compostos antibacterianos naturais promissores que podem substituir os antibióticos na aquicultura.

A quitina é um polímero natural encontrado em exoesqueletos de insetos, crustáceos e fungos, constituindo-se como a segunda biomassa natural mais abundante após a celulose (HAHN *et al.*, 2020). A quitosana, que é obtida pela desacetilação da quitina, possui

propriedades antimicrobianas, imunoestimulantes e antioxidantes, tornando-a uma alternativa promissora para a substituição de antibióticos na aquicultura (HAHN *et al.* 2020). A eficácia antimicrobiana da quitosana é influenciada pelo peso molecular e pelo grau de desacetilação da quitina (BENHABILES *et al.*, 2012; IBAÑEZ-PEINADO *et al.* 2020). Embora as carapaças de crustáceos tenham sido tradicionalmente a principal fonte de quitina (IBAÑEZ-PEINADO *et al.*, 2020), os insetos têm se destacado como uma fonte viável, já que possuem quantidade considerável de quitina em seus exoesqueletos (LUCAS *et al.* 2021).

De acordo com Abidin *et al.* (2020), o menor teor de minerais nos insetos (inferior a 10%) em comparação aos crustáceos (20-40%) permite processos de desmineralização mais brandos, reduzindo o uso de reagentes químicos agressivos. Espécies como o grilo preto (*Gryllus assimilis*) e o tenébrio gigante (*Zophobas morio*) — pertencentes às ordens Orthoptera e Coleoptera, respectivamente — representam uma parcela significativa da biodiversidade de insetos comestíveis e já possuem sistemas de produção estabelecidos (OMUSE *et al.*, 2024). O *G. assimilis*, por exemplo, já demonstrou viabilidade zootécnica como substituto proteico em dietas para tilápias (ALFARO *et al.*, 2019), indicando disponibilidade de biomassa para extração de coprodutos de valor agregado.

Contudo, apesar do potencial reconhecido, ainda existe uma lacuna no conhecimento sobre a eficiência comparativa de métodos de extração que visem tanto a sustentabilidade do processo quanto a manutenção da bioatividade do polímero nessas espécies específicas. A maioria dos estudos, como revisado por Hahn *et al.* (2020), foca na extração química convencional, havendo espaço para explorar métodos biológicos ou assistidos que preservem melhor as propriedades físico-químicas do polímero e garantam sua eficácia biológica. Diante do exposto, este trabalho destaca-se pelo seu ineditismo ao investigar, pela primeira vez na literatura, a obtenção de quitina e quitosana a partir da biomassa do grilo *Gryllus assimilis*. Utilizando a larva de *Zophobas morio* como matriz comparativa, o estudo teve como objetivo central avaliar três metodologias de extração (química, química-biológica e química assistida por enzima) para determinar qual rota proporciona a melhor qualidade estrutural e rendimento do biopolímero. Por fim, para atestar a relevância e a aplicação prática da melhor quitosana obtida, investigou-se sua ação antimicrobiana *in vitro* contra patógenos de impacto global na aquicultura: *Vibrio parahaemolyticus*, *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae*.

## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivo Geral

- Caracterizar a quitina e quitosana extraída de *Gryllus assimilis* e *Zophobas morio* e, determinar sua ação antibacteriana *in vitro* sobre as bactérias *Vibrio parahaemolyticus*,

*Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae*.

## 2.2 Objetivos Específicos

- Extrair e purificar a quitina e quitosana da biomassa de *Gryllus assimilis* e *Zophobas morio*;
- Caracterizar a quitosana extraída quanto à solubilidade, espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) e grau de desacetilação (DD);
- Avaliar, *in vitro*, a ação antibacteriana da quitosana extraída de *G. assimilis* e *Z. morio* sobre *V. aginolyticus*, *A. hydrophila* e *S. agalactiae*;
- Comparar a eficiência dos diferentes métodos.

## 3 Hipóteses

- A quitina e quitosana presente na biomassa de *G. assimilis* e *Z. morio* poderão ser efetivamente extraídas e purificadas;
- A quitosana exibirá atividade antibacteriana significativa *in vitro* contra *V. parahaemolyticus*, *A. hydrophila* e *S. agalactiae* inibindo o crescimento bacteriano e/ou causando morte bacteriana.

## Referências

ABDELLA, B.; SHOKRAK, N. M.; ABOZAHRA, N. A.; ELSHAMY, Y. M.; KADIRA, H. I.; MOHAMED, R. A. Aquaculture and *Aeromonas hydrophila*: a complex interplay of environmental factors and virulence. **Aquaculture International**, v. 32, p. 7671–7681, 2024.

ABIDIN, N. A. Z.; KORMIM, F.; ABIDIN, N. A. Z.; ANUAR, N. A. F.; BAKAR, M. F. A. The Potential of Insects as Alternative Sources of Chitin and Chitosan: An Update. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 18, p. 6587, 2020.

ALFARO, A. O.; LANZA NÚÑEZ, W.; MARCIA, J.; MONTERO FERNÁNDEZ, I. The cricket (*Gryllus assimilis*) as an alternative food versus commercial concentrate for tilapia (*Oreochromis sp.*) in the nursery stage. **Journal of Agricultural Science**, v. 11, p. 97–104, 2019.

BARRETO, A.; SILVA, A.; PEIXOTO, D.; FAJARDO, C.; PINTO, W.; ROCHA, R. J. M.; CONCEIÇÃO, L. E. C.; COSTAS, B. Dietary protein requirements of whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei*) post-larvae during nursery phase in clear-water recirculating aquaculture systems. **Frontiers in Marine Science**, v. 10, p. 1172644, 2023.

BENHABLES, M. S.; SALAH, R.; LOUNICI, H.; DROUCHE, N.; GOOSEN, M. F. A.; MOULAI-MOSTEFA, N. Antibacterial coating of chitosan derivatives on cotton fabric. **Industrial Crops and Products**, v. 40, p. 290-296, 2012.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2024: Blue Transformation in action. Rome: FAO, 2024.

GUARNIERI, A.; TRIUNFO, M.; SCIEUZO, C.; IANNICIELLO, D.; TAFI, E.; HAHN, T.; ZIBEK, S.; SALVIA, R.; DE BONIS, A.; FALABELLA, P. Antimicrobial properties of chitosan from different developmental stages of the bioconverter insect *Hermetia illucens*. **Scientific Reports**, v. 12, 2022.

HAHN, T.; TAFI, E.; PAUL, A.; SALVIA, R.; FALABELLA, P.; ZIBEK, S. Current state of chitin purification and chitosan production from insects. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 95, n. 11, p. 2775–2795, 2020.

HEGDE, A.; KABRA, S.; BASAWA, R. M.; KHILE, D. A.; ABBU, R. U. F.; THOMAS, N. A.; MANICKAM, N. B.; RAVAL, R. Bacterial diseases in marine fish species: current trends and future prospects in disease management. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 317, 2023.

IBAÑEZ-PEINADO, D.; UBEDA-MANZANARO, M.; MARTÍNEZ, A.; RODRIGO, D. Antimicrobial effect of insect chitosan on *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* survival. **PLOS ONE**, v. 15, n. 12, 2020.

ISLAM, S. I.; MAHFUJ, S.; BAQAR, Z.; ASADUJJAMAN, M.; ISLAM, M. J.; ALSIWIEHRI, N.; ALMEHMADI, M.; SANJIDA, S.; AHAMMAD, F. Bacterial diseases of Asian sea bass (*Lates calcarifer*): A review for health management strategies and future aquaculture sustainability. **Heliyon**, v. 10, n. 9, 2024.

LUCAS, A. J. S.; ORESTE, E. Q.; COSTA, H. L. G.; LÓPEZ, H. M.; SAAD, C. D. M.; PRENTICE, C. Extraction, physicochemical characterization, and morphological properties of chitin and chitosan from cuticles of edible insects. **Food Chemistry**, v. 343, 128550, 2021.

OKEKE, E. S.; CHUKWUDOZIE, K. I.; NYARUABA, R.; ITA, R. E.; OLADIPO, A.; EJEROMEDOGENE, O.; ATAKPA, E. O.; AGU, C. V.; OKOYE, C. O. Antibiotic resistance in aquaculture and aquatic organisms: a review of current nanotechnology applications for sustainable management. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, p. 69241–69274, 2022.

OMUSE, E. R.; TONNANG, H. E. Z.; YUSUF, A. A.; MACHEKANO, H.; EGONYU, J. P.; KIMATHI, E.; MOHAMED, S. F.; KASSIE, M.; SUBRAMANIAN, S.; ONDITI, J.; MWANGI, S.; EKESI, S.; NIASSY, S. The global atlas of edible insects: analysis of diversity and commonality contributing to food systems and sustainability. **Scientific Reports**, v. 14, p. 5045, 2024.

RIBEIRO, L. F.; SOUZA, M. M.; BARROS, F.; HATJE, V. Desafios da carcinicultura: aspectos legais, impactos ambientais e alternativas mitigadoras. **Revista de Gestão Costeira Integrada**, v. 14, n. 3, p. 365-383, 2014.

RIVAS, A. V.; DOS SANTOS, A. G. V.; DE SOUZA, A. B.; BUENO JUNIOR, G.; DE SOUZA, G. F.; DE SOUZA, E. M.; DE CARVALHO NUNES, L.; VIANA, K. F. Bivalent Vaccine against *Streptococcus agalactiae* and *Aeromonas hydrophila* in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*): A Laboratory-Phase and Large-Scale Study. **Animals**, v. 13, p. 3338, 2023.

TREIBER, F. M.; BERANEK-KNAUER, H. Antimicrobial residues in food from animal origin — A review of the literature focusing on products collected in stores and markets worldwide. **Antibiotics**, v. 10, p. 534, 2021.

YU, Y. B.; CHOI, J. H.; KANG, J. C.; KIM, H. J.; KIM, J. H. Shrimp bacterial and parasitic disease listed in the OIE: A review. **Microbial Pathogenesis**, v. 166, 2022.

### 3- Artigo Científico

#### Avaliação de diferentes metodologias de extração de quitosana de *Gryllus assimilis* e *Zophobas morio*: caracterização físico-química e atividade antimicrobiana *in vitro*

L.S.D.M. Carvalho<sup>1\*</sup>, V.T. Matias<sup>1</sup>, M.A. da Silva<sup>2</sup>, K.A.L. da Silva<sup>1</sup>, R.L. de Souza<sup>1</sup>, R.S. Bezerra<sup>2</sup> and S.M.B.C. da Silva<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Pesca e Aquicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Brasil.

\* Corresponding author: [larissa.sdmc@gmail.com](mailto:larissa.sdmc@gmail.com) / [suzianny.silva@ufrpe.br](mailto:suzianny.silva@ufrpe.br)

[Journal of Insects as Food and Feed](#)

#### Resumo

Avaliou-se comparativamente a eficiência das metodologias de Extração Química, Extração Química-Biológica e Extração Química Assistida por Enzima na extração de quitina e obtenção de quitosana a partir da biomassa de *Gryllus assimilis* e *Zophobas morio*. Os biopolímeros foram caracterizados por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) e pelo grau de desacetilação (DD), e sua atividade antimicrobiana foi avaliada frente a *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Streptococcus agalactiae*. Os resultados indicaram que a matriz biológica influencia diretamente a eficiência da extração e da desacetilação. De forma inédita, a matriz de *G. assimilis* demonstrou superioridade funcional; quando submetida à Extração Química Assistida por Enzima, apresentou o maior DD (78,01%) e uma atividade antimicrobiana de altíssima potência (CIM de 0,031 a 0,125 mg/mL contra os patógenos testados). Em contrapartida, para *Z. morio*, o elevado teor lipídico limitou o desempenho da Extração Química (DD 67,93%), resultando em bioatividade reduzida (CIM de até 4,000 mg/mL). Entretanto, as rotas biotecnológicas (Extração Química-Biológica e Assistida por Enzima) mostraram-se eficazes em contornar essa limitação, elevando o DD de *Z. morio* para aproximadamente 75% e melhorando expressivamente a inibição bacteriana (CIM mínima alcançada de 0,031 mg/mL). Conclui-se que as abordagens biotecnológicas são superiores às vias químicas puras na obtenção de quitosana de alta qualidade a partir de insetos. O estudo consolida o grilo *G. assimilis* como uma nova e promissora matriz para o desenvolvimento de biopolímeros com potencial aplicação sanitária na aquicultura.

**Palavras-chave:** Insetos; Quitina; Quitosana; Atividade Antimicrobiana; Aquicultura.

#### 1 Introdução

A utilização de insetos na alimentação animal vem se consolidando como uma estratégia sustentável para a segurança alimentar mundial. Além de fornecerem nutrientes de alta qualidade, os insetos possuem exoesqueletos ricos em quitina, um biopolímero com vasto potencial biotecnológico e aplicações industriais, conforme detalhado por Hahn *et al.* (2020) e Son *et al.* (2021). A desacetilação da quitina permite a obtenção de quitosana, um derivado com comprovadas propriedades antimicrobianas, antioxidantes e imunoestimulantes (Hahn *et al.*, 2020; Motte *et al.*, 2019).

A aplicação desses compostos bioativos é particularmente relevante para a aquicultura, um setor que enfrenta constantes desafios sanitários. Historicamente, o controle dessas infecções baseou-se no uso de antibióticos, uma prática que, quando indiscriminada, impulsiona a resistência antimicrobiana e resulta na bioacumulação de resíduos na cadeia

alimentar e no ambiente aquático, conforme alertam Okeke et al. (2022). Nesse sentido, a quitosana e seus derivados emergem como aditivos funcionais promissores, capazes de atuar como imunostimulantes naturais e agentes de biorremediação, substituindo antibióticos e melhorando o desempenho zootécnico (Abu-Elala et al., 2024; Khair et al., 2024).

Embora a quitina seja tradicionalmente extraída de resíduos de crustáceos, a utilização de insetos apresenta vantagens técnicas superiores para o processamento industrial. Espécies como o grilo preto (*Gryllus assimilis*) e o tenébrio gigante (*Zophobas morio*) — pertencentes às ordens Orthoptera e Coleoptera, respectivamente — representam uma parcela significativa da biodiversidade de insetos comestíveis e já possuem sistemas de produção estabelecidos (Omuse et al., 2024). O *G. assimilis*, por exemplo, já demonstrou viabilidade zootécnica como substituto proteico em dietas para tilápias (Alfaro et al., 2019), indicando disponibilidade de biomassa para extração de coprodutos de valor agregado.

Contudo, apesar do potencial reconhecido, ainda existe uma lacuna no conhecimento sobre a eficiência comparativa de métodos de extração que visem tanto a sustentabilidade do processo quanto a manutenção da bioatividade do polímero nessas espécies específicas. Este estudo teve, portanto, como objetivo extrair quitina de *G. assimilis* e *Z. morio* utilizando três metodologias (extração química, extração química-biológica e extração química assistida por enzima), realizar a desacetilação para obtenção de quitosana e caracterizá-la via espectroscopia no infravermelho (FT-IR ATR). Adicionalmente, determinou-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dessas quitosanas contra patógenos de reconhecida importância para a aquicultura e a saúde pública: *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae* e *Vibrio parahaemolyticus*. Dessa forma, a presente pesquisa destaca-se pelo seu pioneirismo ao investigar, de forma inédita, a viabilidade da biomassa do grilo *G. assimilis* para a obtenção de quitosana e, paralelamente, determinar a rota de extração mais eficiente entre as metodologias testadas. Com isso, visa-se fornecer subsídios técnicos para fortalecer a utilização de insetos no contexto de proteína *climate-smart*. Assim, ao integrar os preceitos da biorrefinaria, este estudo entrega à indústria uma alternativa natural, escalável e de alto valor agregado para a mitigação do uso indiscriminado de antibióticos na aquicultura.

## 2 Material e Métodos

### Matéria-prima

Farinhas de *Gryllus assimilis* e *Zophobas morio* foram adquiridas comercialmente da empresa Insetos Brasil Biofábrica (Recife, Pernambuco, Brasil). O material foi fornecido na forma de farinha de biomassa de adultos para *G. assimilis* e farinha de biomassa de larvas para *Z. morio*, ambos armazenados em ultrafreezer a -80 °C.

### Extração da quitina e quitosana

Foram avaliadas três metodologias distintas para cada inseto: (I) Extração Química, otimizada para cada espécie; (II) Extração Química-Biológica; e (III) Extração Assistida por Enzima. Para todas as metodologias avaliadas foram usadas cinco réplicas (n = 5) de peso inicial de 10g/amostra. O rendimento de quitina baseou-se no peso seco em estufa e; o de quitosana, no peso liofilizado. Os rendimentos de quitina e quitosana foram calculados com base no peso inicial da farinha de inseto seca P0 (sempre 10 g), de acordo com a equação (1):

$$\text{Rendimento (\%)} = (\text{Pf} / \text{P0}) \times 100 \quad (1)$$

Onde Pf é o peso da quitina ou quitosana secas e P0 é o peso inicial da farinha de inseto. Essa equação foi utilizada para o cálculo de rendimento nas três metodologias apresentadas nesse trabalho.

### Extração Química (Metodologia I)

As amostras de ambas as espécies receberam um pré-tratamento para ativação de enzimas endógenas (adaptado de Cahú et al., 2012). Para *Z. morio*, realizou-se uma etapa adicional de desengorduramento utilizando solução de Tween 20 (10%, 2h). Seguiu-se à desmineralização (HCl), desproteínização (NaOH, 100°C) em banho-maria, com lavagens até a neutralização entre processos. Devido às diferenças na matriz de quitina de cada espécie, as concentrações e tempos variaram da seguinte maneira: *G. assimilis*, desmineralização foi realizada com HCl 2 N por 3 h e a desproteínização com NaOH 1,25 N por 3 h (Kim et al., 2017). Já para *Z. morio*, a desmineralização foi realizada com HCl 4 M por 1 h (Kaya et al., 2015) e a desproteínização NaOH 2 M por 16 h (Kaya et al., 2015; Soon et al., 2018).

As amostras passaram, então, por uma etapa adicional de descoloração, primeiro em solução de  $\text{KMnO}_4$  0,5% e, depois, em solução de  $\text{NaHSO}_3$  1% (Cahú et al., 2012) e, o material obtido ao fim dessa etapa, após ser lavado e seco, foi pesado para a obtenção de rendimento de quitina. A conversão da quitina em quitosana ocorreu via desacetilação alcalina em banho-maria a 100 °C com solução de NaOH (1:10 m/v) 50% por 3 h (Kim et al., 2017), para *G. assimilis*, e NaOH (1:10 m/v) 55% por 8 h (Shin et al., 2019), para *Z. morio*. Após secagem, as amostras foram submetidas a purificação de acordo com Cahú et al. (2012), liofilizadas e pesadas para obtenção do rendimento final de quitosana.

### Extração Química-Biológica (Metodologia II)

Para esta metodologia, uma cepa bacteriana do gênero *Lactobacillus sp.* (ATCC), cedida pelo Instituto Agrônomo de Pernambuco/IPA (Recife, Pernambuco, Brasil), foi ativada em caldo MRS acrescido de glicose a 5% a 35°C por 48 horas e a concentração celular foi ajustada até atingir a turbidez equivalente à  $10^8$  UFC/ml (Escala McFarland 0,5) (Rao et al., 2000). A solução bacteriana ajustada foi misturada na proporção de 1: 10 (m/v) às farinhas de inseto, formando um meio fermentativo. Posteriormente, esse material foi incubado durante 7 dias a 30°C, na presença de  $\text{CO}_2$  (Khanafari et al., 2008). Ao término dos 7 dias, o meio fermentativo foi centrifugado e os sólidos recuperados foram lavados com água destilada. Após a etapa biológica, seguiram as etapas químicas citada na seção anterior. Foi necessário manter a desmineralização química para a amostra de *G. assimilis*, seguida pela desproteínização e descoloração. Já para *Z. morio*, seguiu-se diretamente para a etapa de desproteínização química (NaOH 2 M por 16 h). A conversão em quitosana seguiu o procedimento de Desacetilação e Purificação descrito pela Metodologia I.

### Extração Química Assistida por Enzima (Metodologia III)

A extração química assistida por enzimas foi conduzida utilizando protease para *Gryllus assimilis* e lipase para *Zophobas morio*. Em ambos os casos, a hidrólise enzimática foi realizada previamente às etapas químicas convencionais.

Para *G. assimilis*, foi utilizada protease de *Bacillus licheniformis* a 0,5% (v/v) ( $\geq 2,4$  U/mg; Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, EUA), preparada em tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0) (Cahú et al., 2012, adaptado). A mistura foi incubada em banho-maria a 50°C por 1 h, seguida de aquecimento a 70°C por 1 h e, posteriormente, a 90°C por 10 min para inativação enzimática. O resíduo sólido foi filtrado, lavado e seco em estufa.

Para *Z. morio*, empregou-se lipase pancreática suína Tipo II a 2% (m/v) ( $\geq 125$  U/mg; Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, EUA), preparada em tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0) (Lucas et al., 2021, adaptado). A mistura foi incubada a 37°C por 1 h, seguida de aquecimento a 70°C por 1 h. Após filtração e lavagem, o material foi tratado com solução de Tween 20 a 10% (v/v) sob agitação por 30 min, novamente lavado e seco em estufa.

Após a hidrólise enzimática, ambas as biomassas foram submetidas às etapas de desmineralização, desproteínização complementar, desacetilação e purificação, conforme descrito na Extração Química, sendo a etapa de descoloração excluída para *Z. morio* nesta

metodologia.

### Determinação da Solubilidade (Qualitativa e Quantitativa)

A eficácia da desacetilação foi avaliada por triagem qualitativa, considerando a solubilidade visual imediata e completa da quitosana em solução de ácido acético a 10%. A solubilidade quantitativa foi determinada conforme método descrito por Luo et al. (2019), com adaptações. A solubilidade (%) foi calculada pela Equação (2):

$$\text{Solubilidade (\%)} = (M_1 - M_2) / (M_1 - M_0) \times 100 \quad (2)$$

Sendo  $M_0$  o peso inicial do tubo vazio,  $M_1$  o peso do tubo mais a quitosana antes da dissolução e  $M_2$  o peso final do tubo contendo o precipitado seco. O ensaio foi realizado em triplicata para cada metodologia de extração, e os resultados expressos como média.

### Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de absorção no infravermelho foram obtidos utilizando um espectrômetro IRSpirit (Shimadzu Corp., Kyoto, Japão), equipado com acessório de Reflectância Total Atenuada (ATR), operando em modo de transmitância (%T), na faixa espectral de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e 45 varreduras por amostra, utilizando apodização SqrTriangle. O processamento espectral e a análise dos dados foram realizados no software OriginPro 2025b (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA). O grau de desacetilação (DD%) foi estimado a partir da razão entre as intensidades das bandas de absorção da amida III (1320  $\text{cm}^{-1}$ ) e da deformação angular C-H (1420  $\text{cm}^{-1}$ ), conforme a equação proposta por Brugnerotto et al. (2001):

$$\text{DD (\%)} = 100 - [(A_{1320} / A_{1420} - 0.3822) / 0.03133] \quad (3)$$

Onde,  $A_{1320}$  e  $A_{1420}$  correspondem às absorvâncias em 1320 e 1420  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. Quando não foi observado um pico máximo bem definido, a intensidade de absorvância foi estimada por interpolação linear entre os pontos espectrais adjacentes.

### Ensaio de atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana das quitosanas foi avaliada frente a *Aeromonas hydrophila* (IOC/FDA 110-36), *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC 17802) e *Streptococcus agalactiae* (ATCC 13813). As cepas foram reativadas conforme recomendações da American Type Culture Collection (ATCC) e cultivadas por 24 h nas seguintes condições: *A. hydrophila* em caldo Nutriente a 30 °C; *S. agalactiae* em caldo Brain Heart Infusion (BHI) a 37 °C; e *V. parahaemolyticus* em caldo Tryptic Soy Broth (TSB) a 37 °C.

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, de acordo com as diretrizes do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, documento M07-A10, 2015). Foram avaliadas amostras compostas (pooled samples) representativas das metodologias de extração. Soluções estoque de quitosana foram preparadas em ácido acético a 0,5% (v/v) para *G. assimilis* (1 mg/mL) e a 0,2% (v/v) para *Z. morio* (4 mg/mL). O ensaio foi conduzido em microplacas estéreis de 96 poços contendo caldo Mueller–Hinton (MHB), utilizando diluições seriadas (1:2), resultando em concentrações finais de 1,0 a 0,002 mg/mL para *G. assimilis* e de 4,0 a 0,008 mg/mL para *Z. morio*.

Os inóculos bacterianos foram padronizados em solução salina estéril (NaCl 0,9%) para turbidez equivalente a 0,5 na escala de McFarland, avaliando-se densidades de  $10^8$  e  $10^6$  UFC/mL. Alíquotas de 20  $\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana foram adicionadas aos poços contendo 100  $\mu\text{L}$  das diluições de quitosana. Os controles incluíram meio com inóculo

bacteriano (controle positivo), meio contendo quitosana sem inóculo e controle de esterilidade do caldo. As placas foram incubadas em aerobiose nas temperaturas específicas supracitadas de cada microrganismo, e a CIM foi definida como a menor concentração de quitosana capaz de inibir visualmente o crescimento bacteriano, evidenciada pela ausência de turbidez.

### Análise estatística

Os ensaios de rendimento e determinação do grau de desacetilação (DD) foram realizados em quintuplicata (n=5), enquanto as análises de solubilidade e atividade antimicrobiana foram conduzidas em triplicata (n=3). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. A normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias foram avaliadas previamente pelos testes de Shapiro-Wilk e de Levene, respectivamente. Para os dados que atenderam aos pressupostos paramétricos, as diferenças entre as médias dos tratamentos foram analisadas por Análise de Variância Unidirecional (One-way ANOVA), seguida do teste post hoc de Tukey. Para as variáveis que não apresentaram distribuição normal e/ou homogeneidade de variâncias, aplicou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de comparações múltiplas pareadas (pairwise comparisons) com ajuste de Bonferroni. Todas as análises estatísticas consideraram um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) e foram conduzidas no software R.

## 3 Resultados e Discussão

### Rendimento de extração de quitina e quitosana

Os rendimentos de quitina e quitosana variaram conforme a espécie e a metodologia empregada (Tabela 1). Para *G. assimilis*, a Extração Química (I) e a Extração Química Assistida por Enzima (III) superaram a Extração Química-Biológica (II) ( $p < 0,05$ ). Em contraste, para *Z. morio*, não houve diferença estatística entre as metodologias tanto para o rendimento de quitina (3,06 - 3,50%) quanto para o de quitosana (1,25 - 1,74%). Entretanto, observa-se que os rendimentos absolutos de ambos os biocompostos para *Z. morio* foram significativamente inferiores aos de *G. assimilis*.

Tabela 1. Rendimentos de quitina e quitosana, solubilidade e grau de desacetilação (DD) obtidos a partir de *Gryllus assimilis* e *Zophobas morio* submetidos a diferentes metodologias de extração.

Espécie	Metodologia	Rendimento Quitina (%)	Rendimento Quitosana (%)	Solubilidade (%)	DD (%)
<i>G. assimilis</i>	I (Química)	5,92 $\pm$ 0,83 <sup>a</sup>	3,89 $\pm$ 0,82 <sup>a</sup>	9,03 $\pm$ 0,96 <sup>b</sup>	75,89 $\pm$ 1,49 <sup>ab</sup>
	II (Química-Biológica)	4,48 $\pm$ 0,61 <sup>b</sup>	2,22 $\pm$ 0,58 <sup>b</sup>	79,00 $\pm$ 6,24 <sup>a</sup>	73,16 $\pm$ 4,03 <sup>b</sup>
	III (Química Assistida por Enzima)	6,11 $\pm$ 0,45 <sup>a</sup>	2,86 $\pm$ 0,77 <sup>ab</sup>	59,33 $\pm$ 14,01 <sup>a</sup>	78,01 $\pm$ 1,03 <sup>a</sup>
<i>Z. morio</i>	I (Química)	3,50 $\pm$ 0,34 <sup>a</sup>	1,25 $\pm$ 0,38 <sup>a</sup>	92,33 $\pm$ 4,04 <sup>a</sup>	67,62 $\pm$ 1,58 <sup>b</sup>
	II (Química-Biológica)	3,32 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>	1,74 $\pm$ 0,38 <sup>a</sup>	57,00 $\pm$ 7,21 <sup>b</sup>	74,25 $\pm$ 0,56 <sup>a</sup>
	III (Química Assistida por Enzima)	3,06 $\pm$ 0,48 <sup>a</sup>	1,66 $\pm$ 0,47 <sup>a</sup>	58,33 $\pm$ 7,64 <sup>b</sup>	75,54 $\pm$ 1,41 <sup>a</sup>

O rendimento de Quitina foi calculado com base na massa seca em estufa. O rendimento de Quitosana e o DD representam a média  $\pm$  desvio padrão (n=5) da amostra liofilizada. Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna, para a mesma espécie, diferem estatisticamente (Tukey,  $p < 0,05$ ).

A diferença expressiva nos rendimentos entre as espécies pode ser atribuída, em grande parte, ao estágio de desenvolvimento e à composição corporal. O rendimento obtido para *G. assimilis* (adulto) foi aproximadamente o dobro do observado para *Z. morio* (larva).

Esse achado corrobora a literatura, que indica que a esclerotização do exoesqueleto em insetos adultos aumenta significativamente o teor de quitina recuperável. Enquanto estudos com adultos de *Z. morio* relatam rendimentos de até 22% (Keerthika e Jayakumar, 2024), os valores obtidos neste trabalho (~3,5%) alinham-se à literatura específica para larvas (Shin et al., 2019; Soon et al., 2018). Isso confirma que o processamento da biomassa integral, em detrimento do uso exclusivo de exúvias ou cutículas, dilui significativamente o rendimento, conforme demonstrado por Song et al. (2018).

Adicionalmente, a elevada fração lipídica representa um desafio para *Z. morio*, com teores frequentemente superiores a 40%. Embora Zhatkanbayeva *et al.* (2025) tenham demonstrado a eficiência de solventes orgânicos na deslipidização, no presente trabalho optou-se pelo uso de solução de Tween 20. Esta alternativa, menos tóxica e ambientalmente segura, é capaz de emulsificar lipídios e facilitar sua remoção sem comprometer a estrutura proteica (Chen *et al.*, 2020). Diferentemente de Lucas *et al.* (2021), que obtiveram elevados rendimentos por via enzimática a partir de cutículas isoladas, a metodologia química aqui apresentada mostrou-se mais eficiente para a larva integral, possivelmente devido à maior capacidade dos reagentes alcalinos em romper a matriz lipídica densa, efeito potencializado pela ação do surfactante.

Essa influência direta da composição da matéria-prima no rendimento final — seja pela escolha de processar a biomassa integral ou de isolar previamente estruturas ricas em quitina, como carapaças e exúvias — é um padrão amplamente documentado não apenas para insetos, mas para diversas matrizes biológicas. Como pode ser observado na Tabela 2, os rendimentos globais de quitina variam expressivamente de acordo com a origem taxonômica e a fração anatômica utilizada. Os valores situam-se entre 7,40% e 30,33% para matrizes fúngicas, 10,60% e 62,95% para fontes marinhas (crustáceos), e 3,90% e 70,90% para a classe Insecta. Tais variações evidenciam que os dados obtidos neste estudo (4,48% a 6,11% para *G. assimilis* e 3,06% a 3,50% para *Z. morio*) estão em plena consonância com a literatura para o processamento de insetos inteiros, demonstrando forte competitividade frente aos desafios estruturais da matriz.

Tabela 2. Comparativo do rendimento de quitina e quitosana de diferentes matrizes biológicas reportadas na literatura em relação aos resultados obtidos neste estudo.

Fonte	Espécie	Metodologia de Extração	Rendimento de Quitina (%)	Rendimento de Quitosana (%)	Matriz Biológica	Referência
Fúngica	<i>Cunninghamella sp.</i>	Química	15.64 – 30.33	0.94 – 7.43	Micélio	Chagas Junior <i>et al.</i> (2022)
	<i>Agaricus bisporus</i>	Química Modificada	7.4	41%	Estipe	Hassainia <i>et al.</i> (2020)
	<i>Lactarius vellereus</i>	Química	11.4	73.1*	Fungo Inteiro	Erdogan <i>et al.</i> (2017)
	<i>Phyllophora ribis</i>	Química	7.9	75.3*	Fungo Inteiro	Erdogan <i>et al.</i> (2017)
	<i>Basidiomicetos</i>	Química	8.5 a 19.6	1.00	Micélio	Di Mario <i>et al.</i> (2008)
	<i>Aspergillus niger</i>	Química	7.50 (Pura) / 24.01 (Bruta)	0.00	Micélio	Wu <i>et al.</i> (2005)
	<i>Mucor rouxii</i>	Química	7.80(Pura) / 13.25 (Bruta)	12.49	Micélio	Wu <i>et al.</i> (2005)
Marinha	<i>Macrobrachium dayanum</i>	Química	13.43	11.62	Casca de camarão	Kerketta (2024)
	<i>Penaeus notialis</i>	Química	26.08	16.93	Cascas	Olafadehan <i>et al.</i> (2020)

	<i>Callinectes amnicola</i>	Química	19.36	13.29	Cascas	Olafadehan <i>et al.</i> (2020)
	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Química	10.6	7.2	Cabeças de Camarão	Cahú <i>et al.</i> (2012)
	<i>Penaeus semisulcatus</i>	Química	51	41	Resíduos de camarão	Khanafari <i>et al.</i> (2008)
	<i>Penaeus semisulcatus</i>	Biológica / Microbiana	70.0	31 – 42	Resíduos de camarão	Khanafari <i>et al.</i> (2008)
Entomológica	<i>Hermetia illucens</i>	Química / Biológica	36.8	6.35	Pupa	Mohamed <i>et al.</i> (2025)
	<i>Zophobas morio</i>	Química	22.27	19.17	Adulto Inteiro	Keerthika & Jayakumar (2024)
	<i>Tenebrio molitor</i>	Química / Enzimática	70.9	31.9	Cutículas	Lucas <i>et al.</i> (2021)
	<i>Tenebrio molitor</i>	Química	4.72	N/A	Larva Inteira	Son <i>et al.</i> (2021)
	<i>Tenebrio molitor</i>	Química	4.60	80.00*	Larva Inteira	Shin <i>et al.</i> (2019)
	<i>Tenebrio molitor</i>	Química	8.40	78.33*	Adulto Inteiro	Shin <i>et al.</i> (2019)
	<i>Zophobas morio</i>	Química	3.90	83.33*	Larva Inteira	Shin <i>et al.</i> (2019)
	<i>Allomyrina dichotoma</i>	Química	10.53	83.37*	Larva Inteira	Shin <i>et al.</i> (2019)
	<i>Allomyrina dichotoma</i>	Química	12.70	83.37*	Pupa	Shin <i>et al.</i> (2019)
	<i>Allomyrina dichotoma</i>	Química	14.20	75.00*	Adulto Inteiro	Shin <i>et al.</i> (2019)
	<i>Brachytrupes portentosus</i>	Química	4.3 – 7.1	2.4 – 5.8	Adulto Inteiro	Ibitoye <i>et al.</i> (2018)
	<i>Tenebrio molitor</i>	Química	4.92	3.65	Larva Inteira	Song <i>et al.</i> (2018)
	<i>Tenebrio molitor</i>	Química	18.01	9.20	Exúvia Larval	Song <i>et al.</i> (2018)
	<i>Zophobas morio</i>	Química	4.77 – 5.43	65.84* / 75.52*	– Larva Inteira	Soon <i>et al.</i> (2018)
	<i>Gryllus bimaculatus</i>	Química	10.91	7.50	Exoesqueleto (adulto)	Kim <i>et al.</i> (2017)
	<i>Gryllus assimilis</i>	Química	5.92	3.98	Adulto Inteiro	<b>Neste Trabalho</b>
	<i>Gryllus assimilis</i>	Química-Biológica	4.48	2.22	Adulto Inteiro	<b>Neste Trabalho</b>
	<i>Gryllus assimilis</i>	Química Assistida por Enzima	6.11	2.86	Adulto Inteiro	<b>Neste Trabalho</b>
<i>Zophobas morio</i>	Química	3.50	1.25	Larva Inteira	<b>Neste Trabalho</b>	
<i>Zophobas morio</i>	Química-Biológica	3.32	1.74	Larva Inteira	<b>Neste Trabalho</b>	

<i>Zophobas morio</i>	Química Assistida por 3.06 Enzima	1.66	Larva Inteira	<b>Neste Trabalho</b>
-----------------------	---	------	------------------	---------------------------

Os rendimentos de quitina foram avaliados em todos os estudos com base no peso seco da matéria-prima. Valores com (\*) indicam que a quitosana foi calculada com base no valor obtido de quitina.

No que tange à quitosana — principal biopolímero de interesse —, é imperativo destacar uma divergência metodológica frequentemente omitida na literatura. Diversos autores, tanto em extrações fúngicas quanto entomológicas, reportam o rendimento da quitosana com base na massa da quitina intermediária isolada, o que inflaciona artificialmente os valores percentuais (fenômeno sinalizado na Tabela 2). Em contrapartida, as taxas de conversão observadas para *G. assimilis* (atingindo até 3,88%) e *Z. morio* (até 1,74%) neste estudo foram calculadas sobre o peso seco da biomassa inicial integral, após processos de purificação e liofilização da quitosana obtida, livre de resíduos reacionais. Esse rigor analítico confere total transparência aos resultados e estabelece uma base de conversão realista para futuras projeções de aplicação e escalonamento.

Ao expandir a análise para a viabilidade em larga escala, a superioridade estratégica dos insetos como fonte biopolimérica frente aos crustáceos e fungos consolida-se por fatores logísticos, ambientais e biológicos. Diferentemente da carcinicultura, que depende de zonas costeiras e sofre com a sazonalidade, os insetos figuram em sistemas de produção amplamente mapeados e consolidados em nível global (Omuse *et al.*, 2024). São animais com ciclos de vida extremamente curtos, que podem ser criados em ambientes controlados, exigindo área geográfica reduzida e apresentando alta eficiência de conversão alimentar (van Huis *et al.*, 2013). Além disso, as biofábricas de insetos atuam reciclando fluxos de resíduos orgânicos (*biowaste*), o que impulsiona a geração de renda e viabiliza economicamente todo o sistema. A geração de produtos de valor agregado, como a quitina e a quitosana, atesta que os insetos são uma autêntica fonte de proteína *climate-smart* (Tanga *et al.*, 2021). Em contrapartida, a produção de quitosana fúngica carece de métodos padronizados em escala industrial e esbarra em altos custos operacionais (Hussain *et al.*, 2025). Nesse sentido, a extração de quitosana converte os exoesqueletos residuais da cadeia entomológica em biomateriais de alto valor agregado, viabilizando um modelo logístico independente e perfeitamente alinhado à biorrefinaria e à economia circular.

## Solubilidade

A solubilidade da quitosana é um parâmetro multifatorial, influenciado principalmente pelo grau de desacetilação (DD), pela massa molecular viscosimétrica (Mv) e pela origem biológica do polímero, conforme descrito por Luo *et al.* (2019). No presente estudo, observou-se um comportamento contrastante entre as espécies e as metodologias empregadas (Tabela 1). A quitosana obtida por via química de *Z. morio* apresentou a maior solubilidade (92,3%), apesar do menor DD (67,62%). Esse resultado corrobora os achados de Keerthika e Jayakumar (2024), que atribuíram esse comportamento ao baixo peso molecular e à natureza mais amorfa do polímero, fatores que favorecem sua dispersão em meio ácido.

Em contraste, a quitosana obtida por via enzimática de *G. assimilis* apresentou solubilidade intermediária (59,33%), apesar do elevado DD (78,01%), o que pode ser justificado pela predominância de cadeias poliméricas mais longas e estruturalmente íntegras. Esse comportamento é compatível com os efeitos da etapa de descoloração, que promove a remoção de complexos quitina–melanina e proteínas, resultando em maior massa molecular, aumento da viscosidade e tendência à gelificação, conforme discutido por Psarianos *et al.* (2025). Dessa forma, as diferenças de solubilidade observadas neste estudo podem estar majoritariamente relacionadas às particularidades da matriz biológica e ao estágio de desenvolvimento dos insetos, e não exclusivamente à metodologia de extração

empregada.

### Caracterização espectroscópica (FT-IR) e Grau de Desacetilação (DD%)

A análise dos espectros de FT-IR (Figura 1) confirmou a identidade estrutural dos biopolímeros isolados. Em todas as amostras, observou-se uma banda larga e intensa na região de 3450–3200  $\text{cm}^{-1}$ , atribuída ao estiramento axial dos grupos hidroxila (–OH) e amina (–NH<sub>2</sub>). Adicionalmente, as bandas localizadas entre 2960 e 2850  $\text{cm}^{-1}$  correspondem aos estiramentos assimétrico e simétrico das ligações C–H de grupos metila e metileno da estrutura piranosídica, padrão também reportado para *T. molitor* e *Z. morio* por Shin *et al.* (2019) e Lucas *et al.* (2021).

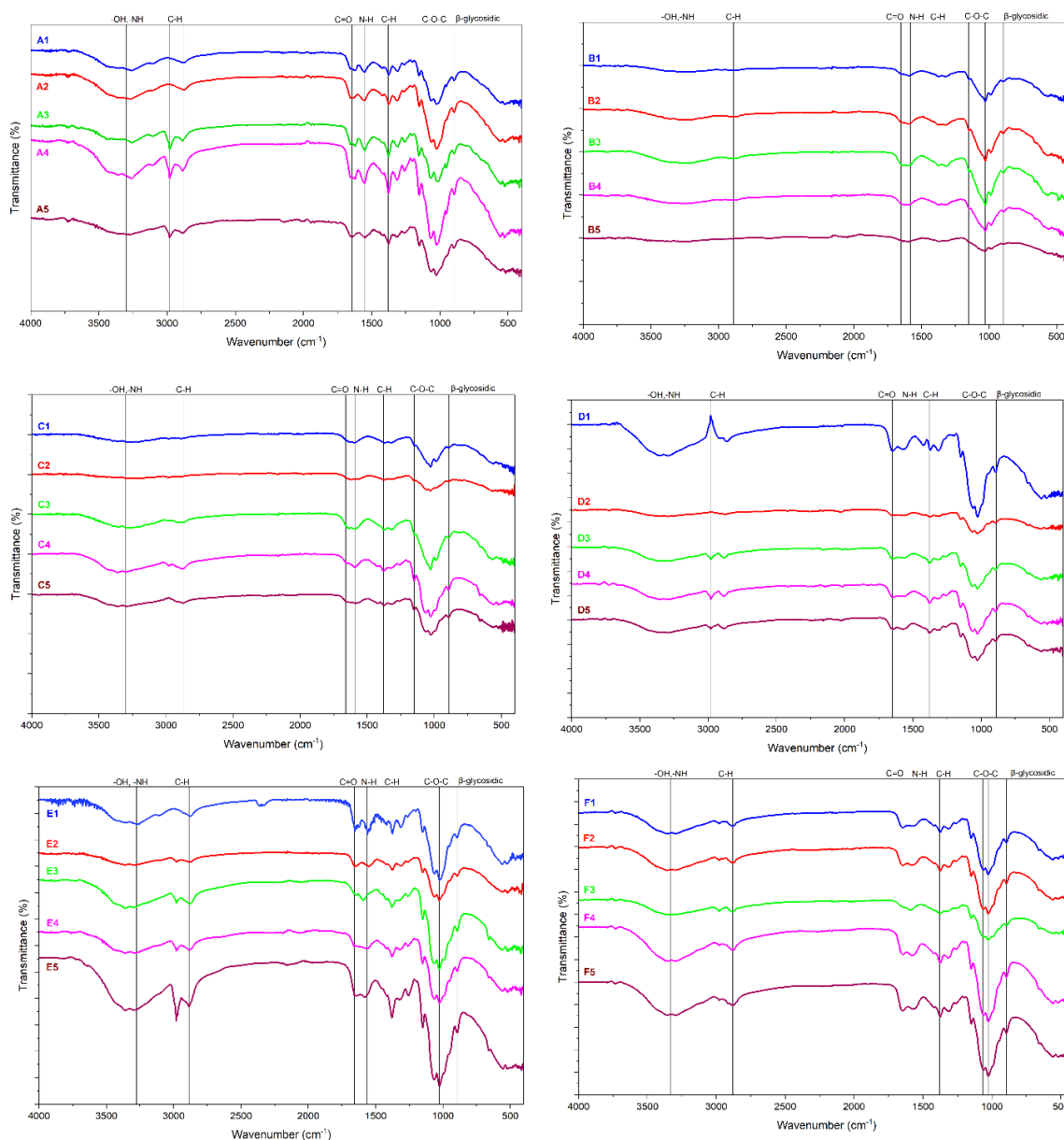


Figura 1. Espectros de FTIR de quitina e quitosana extraídas de *Gryllus assimilis* (coluna esquerda) e *Zophobas morio* (coluna direita) utilizando três metodologias distintas. (A, B) Extração Química; (C, D) Extração Química-Biológica e; (E, F) Extração Química Assistida por Enzima. As linhas verticais indicam as principais bandas características: estiramento O–H/N–H (3450–3200  $\text{cm}^{-1}$ ), estiramento C–H (2880–2850  $\text{cm}^{-1}$ ), Amida I ( $\approx 1650$ – $1620$   $\text{cm}^{-1}$ ), Amida II ( $\approx 1560$ – $1540$   $\text{cm}^{-1}$ ) e ligação  $\beta$ -glicosídica (C–O–C,  $\sim 1150$ – $1020$   $\text{cm}^{-1}$ ). As réplicas ( $n = 5$ ) são apresentadas de forma empilhada para demonstrar a reprodutibilidade do processo.

A eficiência do processo de desacetilação foi avaliada a partir do comportamento das

bandas de Amida. Nas amostras em que a conversão foi incompleta — especialmente em *Z. morio* submetido a extração química — observou-se a persistência de bandas em torno de  $1655\text{ cm}^{-1}$  (Amida I, estiramento C=O) e  $1560\text{ cm}^{-1}$  (Amida II, deformação N-H). Já a redução acentuada ou o desaparecimento desse desdobramento nas amostras de *G. assimilis* obtidas pela metodologia de extração assistida por enzima confirma a conversão bem-sucedida da quitina em quitosana. Esse comportamento espectral é acompanhado pela diminuição da intensidade da banda de Amida I e pelo aumento relativo da banda associada a grupos amina livres ( $\sim 1590\text{ cm}^{-1}$ ), em concordância com os resultados reportados por Ibitoye et al. (2018) para grilos domésticos.

A quantificação do Grau de Desacetilação (DD%) foi realizada utilizando a razão entre as bandas  $A_{1320}/A_{1420}$  (Tabela 1) e demonstrou que a matriz biológica exerce influência direta sobre a eficiência da desacetilação. Enquanto a rota enzimática (III) garantiu o maior valor numérico de DD para *G. assimilis* (78,01%), a elevada carga lipídica de *Z. morio* limitou severamente o método químico convencional que resultou no menor DD (67,93%), diferindo estatisticamente ( $p < 0,05$ ) das rotas biológica (74,25%) e enzimática (75,54%). A presença de bandas intensas em  $\sim 2925\text{ cm}^{-1}$  nesta amostra indica a persistência de lipídios residuais e a formação de complexos hidrofóbicos que dificultam a ação alcalina (Marangon et al., 2024). Entretanto, os pré-tratamentos biotecnológicos (Métodos II e III) foram eficazes em romper essa barreira, elevando o DD para níveis próximos de 75%, comparáveis aos relatados para larvas da mesma espécie (Shin et al., 2019).

### Atividade Antimicrobiana (CIM)

A atividade antimicrobiana apresentou dependência significativa da interação entre espécie e método de extração (Tabela 3). Para *G. assimilis*, as quitosanas mantiveram valores de CIM extremamente baixos (0,031–0,250 mg/mL), independentemente da rota de extração. Ressalta-se que os controles de solvente apresentaram CIMs na faixa de 1,05 a 2,63 mg/mL aproximadamente, confirmando que a inibição eficaz observada nas amostras de grilo (CIM  $< 0,250\text{ mg/mL}$ ) decorre da ação intrínseca do biopolímero, e não da acidez do meio (Guarnieri et al., 2022). Estatisticamente, a Metodologia III (enzimática) destacou-se frente a *V. parahaemolyticus* em alta densidade bacteriana ( $10^8\text{ UFC/mL}$ ), superando a rota química ( $p < 0,05$ ) e posicionando a matriz inédita como uma alternativa altamente competitiva, com eficácia superior à de fontes marinhas tradicionalmente reportadas (Shanmugam et al., 2016).

Tabela 3. Atividade antimicrobiana (CIM, mg/mL) das quitosanas de *Gryllus assimilis* e *Zophobas morio* obtidas por diferentes metodologias de extração frente a bactérias patogênicas.

Espécie	Metodologia	CIM (mg/mL)					
		<i>A. hydrophila</i>		<i>V. parahaemolyticus</i>		<i>S. agalactiae</i>	
		$10^6$ UFC/ml	$10^8$ UFC/ml	$10^6$ UFC/ml	$10^8$ UFC/ml	$10^6$ UFC/ml	$10^8$ UFC/ml
<i>G. assimilis</i>	I (Química)	0,063 <sup>a</sup>	0,125 <sup>a</sup>	0,031 <sup>a</sup>	0,125 <sup>a</sup>	0,125 <sup>b</sup>	0,250 <sup>a</sup>
	II (Química-Biológica)	0,031 <sup>a</sup>	0,063 <sup>b</sup>	0,062 <sup>a</sup>	0,125 <sup>a</sup>	0,250 <sup>a</sup>	0,250 <sup>a</sup>
	III (Química Assistida por Enzima)	0,062 <sup>a</sup>	0,063 <sup>b</sup>	0,031 <sup>a</sup>	0,063 <sup>b</sup>	0,125 <sup>b</sup>	0,125 <sup>b</sup>
<i>Z. morio</i>	I (Química)	0,500 <sup>a</sup>	1,000 <sup>a</sup>	0,500 <sup>a</sup>	2,000 <sup>a</sup>	4,000 <sup>a</sup>	4,000 <sup>a</sup>
	II (Química-Biológica)	0,250 <sup>ab</sup>	0,500 <sup>b</sup>	0,063 <sup>ab</sup>	0,125 <sup>b</sup>	2,000 <sup>b</sup>	2,000 <sup>b</sup>
	III (Química Assistida por Enzima)	0,125 <sup>b</sup>	0,500 <sup>b</sup>	0,031 <sup>b</sup>	0,125 <sup>b</sup>	2,000 <sup>b</sup>	2,000 <sup>b</sup>

Letras minúsculas distintas na mesma coluna (comparando as metodologias de extração dentro da mesma espécie) indicam diferença estatística significativa pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de comparações pareadas com ajuste de Bonferroni ( $p < 0,05$ ). O controle de solvente (ácido acético) apresentou CIM na faixa de 1,05 a 2,63 mg/mL. Dessa forma, confirma-se que a elevada eficácia inibitória observada nas amostras com concentrações inferiores a 1,0 mg/mL decorre exclusivamente da ação biológica da quitosana.

Em contrapartida, para *Z. morio*, o impacto da metodologia foi determinante e evidenciou as limitações intrínsecas da matriz larval sob processamento convencional. A extração química (Metodologia I) resultou nas maiores médias de CIM, atingindo valores de até 4,000 mg/mL contra *S. agalactiae*. Neste cenário específico de concentrações elevadas ( $\geq 2,000$  mg/mL), a concentração inibitória sobrepõe-se à faixa de toxicidade do controle de solvente, sugerindo que a quitosana obtida por esta rota possui bioatividade limitada, refletindo, possivelmente, o baixo grau de desacetilação obtido e, dessa forma, impossibilitando isolar o efeito antimicrobiano do polímero da ação inibitória da acidez do meio. Contudo, a rota enzimática (Metodologia III) promoveu recuperação significativa da atividade antimicrobiana, evidenciada pela redução da CIM frente a *A. hydrophila* de 0,500 mg/mL para 0,125 mg/mL — afastando-se da zona de interferência do solvente. Essa melhora correlacionou-se diretamente com o aumento do DD (Tabela 1), indicando que a maior densidade de cargas positivas (grupos  $\text{NH}_3^+$ ) compensou as limitações impostas pela densa matriz lipídica larval e a menor eficiência da rota química tradicional, corroborando Sheng et al. (2022).

Quanto à suscetibilidade microbiana, as bactérias Gram-negativas (*V. parahaemolyticus* e *A. hydrophila*) mostraram-se significativamente mais sensíveis ( $p < 0,05$ ) à ação da quitosana, em concordância com o mecanismo de interação eletrostática entre os grupos amino protonados do polímero e os componentes aniônicos da membrana externa, resultando em perda da integridade celular (Shanmugam et al., 2016; Guarnieri et al., 2022; Yan et al., 2021). Por outro lado, *S. agalactiae* apresentou maior resistência, especialmente frente às quitosanas de *Z. morio* (CIM de 2,000 a 4,000 mg/mL), comportamento atribuído à espessa camada de peptidoglicano que atua como barreira física à penetração do polímero — particularmente quando este apresenta menor grau de desacetilação ou maior massa molecular —, em contraste com a elevada eficácia observada para a quitosana de *G. assimilis* contra este mesmo patógeno (CIM máximo de 0,250 mg/mL) reforçando a superioridade estrutural e a viabilidade biotecnológica desta nova matriz biológica.

#### 4 Conclusão

Este estudo confirmou a viabilidade técnica da extração de quitosana a partir de *Gryllus assimilis* e *Zophobas morio*, evidenciando que a eficiência do processo depende da interação entre a metodologia aplicada e a matriz biológica. A rota enzimática destacou-se por maximizar a qualidade estrutural e a potencializar a atividade antimicrobiana em *G. assimilis*. Por sua vez, para *Z. morio*, as estratégias biotecnológicas mostraram-se essenciais para contornar as limitações impostas pela sua complexa matriz lipídica, a qual compromete de forma severa o desempenho da via química convencional. A correlação direta entre o grau de desacetilação obtido por métodos ecologicamente mais amigáveis e a inibição eficaz de patógenos críticos sustenta o pioneirismo e o potencial do grilo *G. assimilis* como fonte alternativa de biopolímeros. Dessa forma, as quitosanas derivadas de insetos consolidam-se como alternativas sustentáveis para a substituição de antibióticos na aquicultura, aliando a valorização de biomassa aos preceitos da economia circular e da segurança sanitária.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Processo nº 405513/2023-2) pelo suporte financeiro. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 (Nº do processo 88887.951227/2024-00). Os autores também expressam sua gratidão à Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) pelo suporte técnico nas análises de FTIR.

## Referências

- Abu-Elala, N.M., Hossam-Elden, N., Marzouk, M.S. and El Basuini, M.F., 2024. Chitosan for aquaculture: growth promotion, immune modulation, antimicrobial activity, bio-carrier utility, water quality management, and safety considerations. *Annals of Animal Science*. <https://doi.org/10.2478/aoas-2024-0079>
- Alfaro, A.O., Lanza Núñez, W., Marcia, J. and Montero Fernández, I., 2019. The cricket (*Gryllus assimilis*) as an alternative food versus commercial concentrate for tilapia (*Oreochromis* sp.) in the nursery stage. *Journal of Agricultural Science* 11: 97–104. <https://doi.org/10.5539/jas.v11n6p97>
- Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F.M., Argüelles-Monal, W., Desbrières, J. and Rinaudo, M., 2001. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer* 42(8): 3569–3580. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(00\)00713-8](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(00)00713-8)
- Cahú, T.B., Santos, S.D., Mendes, A., Córdula, C.R., Chavante, S.F., Carvalho Jr., L.B., Nader, H.B. and Bezerra, R.S., 2012. Recovery of protein, chitin, carotenoids and glycosaminoglycans from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) processing waste. *Process Biochemistry* 47: 570–577. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.12.012>
- Chagas Junior, A.F., Chagas, L.F.B., Scheidt, G.N., Chapla, V.M., Colonia, B.S.O., Souza, M.C. and Martins, A.L.L., 2022. Chitosan and chitin production and extraction in isolates of *Cunninghamella* sp. *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 44: e59982. <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v44i1.59982>
- Chen, J., Feng, Y., Kong, B., Xia, X. and Liu, Q., 2020. An eco-friendly extraction method for adsorbed proteins from emulsions stabilized by whey protein isolate by using Tween 20. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 604: 125332. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.125332>
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), 2015. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—10th Edition. CLSI document M07-A10. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Di Mario, F., Rapana, P., Tomati, U. and Galli, E., 2008. Chitin and chitosan from Basidiomycetes. *International Journal of Biological Macromolecules* 43: 8-12. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2007.10.005>
- Erdogan, S., Kaya, M. and Akata, I., 2017. Chitin extraction and chitosan production from cell wall of two mushroom species (*Lactarius vellereus* and *Phyllophora ribis*). *AIP Conference Proceedings* 1809: 020012. <https://doi.org/10.1063/1.4975427>
- Guarnieri, A., Triunfo, M., Scieuzo, C., Ianniciello, D., Tafi, E., Hahn, T., Zibek, S., Salvia, R., De Bonis, A. and Falabella, P., 2022. Antimicrobial properties of chitosan from different developmental stages of the bioconverter insect *Hermetia illucens*. *Scientific Reports* 12: 8084. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12150-3>
- Hahn, T., Tafi, E., Paul, A., Salvia, R., Falabella, P. and Zibek, S., 2020. Current state of chitin purification and chitosan production from insects. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 95: 2775–2795. <https://doi.org/10.1002/jctb.6533>
- Hassainia, A., Satha, H. and Sami, B., 2020. Two routes to produce chitosan from *Agaricus bisporus*. *Journal of Renewable Materials* 8: 1063-1077.

<https://doi.org/10.32604/jrm.2020.07725>

Hussain, M., Sam, S.T., Yaacob, N.D. and Tan, W.K., 2025. Fungal chitosan in focus: a comprehensive review on extraction methods and applications. *Food Research International* 220: 117103. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2025.117103>

Ibitoye, E.B., Lokman, I.H., Hezme, M.N.M., Goh, Y.M., Zuki, A.B.Z. and Jimoh, A.A., 2018. Extraction and physicochemical characterization of chitin and chitosan isolated from house cricket. *Biomedical Materials* 13: 025009. <https://doi.org/10.1088/1748-605x/aa9dde>

Kaya, M., Erdogan, S., Mol, A. and Baran, T., 2015. Comparison of chitin structures isolated from seven Orthoptera species. *International Journal of Biological Macromolecules* 72: 797–805. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.09.034>

Keerthika, K. and Jayakumar, M., 2024. Extraction, characterization and evaluation of antimicrobial activity of chitosan from adult *Zophobas morio* (Fabricius, 1776) (Coleoptera: Tenebrionidae). *International Journal of Biological Macromolecules* 279: 135188. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.135188>

Kerketta, P., 2024. Determination of minimum inhibitory concentration for chitosan extracted from freshwater prawn, *Macrobrachium dayanum* (Henderson, 1893) against Gram negative bacteria. *International Journal of Advanced Biochemistry Research* 8: 194–200. <https://doi.org/10.33545/26174693.2024.v8.i2Sc.537>

Khair, U.U., Fatima, Z., Ahmad, H., Maqaddas, S., Ashraf, A., Maheen, N., Muqadas, Qureshi, M.A. and Qurashi, M.F., 2024. Natural feed additives for animals' growth and production. In: Abbas, R.Z., Akhtar, T., Asrar, R., Khan, A.M.A. and Saeed, Z. (eds.) *Complementary and Alternative Medicine: Feed Additives*. Unique Scientific Publishers, Faisalabad, Pakistan, pp. 29–35. <https://doi.org/10.47278/book.CAM/2024.037>

Khanafari, A., Marandi, R. and Sanatei, Sh., 2008. Recovery of chitin and chitosan from shrimp waste by chemical and microbial methods. *Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering* 5: 19–24.

Kim, M.-W., Song, Y.-S., Han, Y.S., Jo, Y.H., Choi, M.H., Park, Y.-K., Kang, S.H., Kim, S.-A., Choi, C. and Jung, W.-J., 2017. Production of chitin and chitosan from the exoskeleton of adult two-spotted field crickets (*Gryllus bimaculatus*). *Entomological Research* 47: 279–285. <https://doi.org/10.1111/1748-5967.12239>

Lucas, A.J.S., Oreste, E.Q., Costa, H.L.G., López, H.M., Saad, C.D.M. and Prentice, C., 2021. Extraction, physicochemical characterization, and morphological properties of chitin and chitosan from cuticles of edible insects. *Food Chemistry* 343: 128550. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128550>

Luo, Q., Wang, Y., Han, Q., Ji, L., Zhang, H., Fei, Z. and Wang, Y., 2019. Comparison of the physicochemical, rheological, and morphologic properties of chitosan from four insects. *Carbohydrate Polymers* 209: 266–275. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.01.030>

Marangon, A., Paul, G., Zaghi, R., Marchese, L. and Gatti, G., 2024. Chitin extracted from Black Soldier Fly larvae at different growth stages. *Polymers* 16: 2861. <https://doi.org/10.3390/polym16202861>

Mohamed, F.K., El-Shall, F.N., El Awady, M.E., Yassin, M.H. and Dawwam, G.E., 2025. A prospective chitosan produced from a biological source: extraction, characterization, and assessment of biological performance. *Journal of Basic and Environmental Sciences* 12: 133–151. <https://doi.org/10.21608/jbes.2025.396559.1023>

Motte, C., Rios, A., Lefebvre, T., Do, H., Henry, M. and Jintasataporn, O., 2019. Replacing fish meal with defatted insect meal (yellow mealworm *Tenebrio molitor*) improves the growth and immunity of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Animals* 9: 258. <https://doi.org/10.3390/ani9050258>

Okeke, E.S., Chukwudozie, K.I., Nyaruaba, R., Ita, R.E., Oladipo, A., Ejeromedoghene, O., Atakpa, E.O., Agu, C.V. and Okoye, C.O., 2022. Antibiotic resistance in aquaculture and aquatic organisms: a review of current nanotechnology applications for sustainable management. *Environmental Science and Pollution Research* 29: 69241–69274. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-22319-y>

Olafadehan, O.A., Amoo, K.O., Ajayi, T.O. and Bello, V.E., 2020. Extraction and characterization of chitin and chitosan from *Callinectes amnicola* and *Penaeus notialis* shell

- wastes. *Journal of Chemical Engineering and Materials Science* 11: 17-30. <https://doi.org/10.5897/JCEMS2020.0353>
- Omuse, E.R., Tonnang, H.E.Z., Yusuf, A.A., Machekano, H., Egonyu, J.P., Kimathi, E., Mohamed, S.F., Kassie, M., Subramanian, S., Onditi, J., Mwangi, S., Ekesi, S. and Niassy, S., 2024. The global atlas of edible insects: analysis of diversity and commonality contributing to food systems and sustainability. *Scientific Reports* 14: 5045. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-55603-7>
- Psarianos, M., Marzban, N., Ojha, S., Schneider, R. and Schlüter, O.K., 2025. Functional and bioactive properties of chitosan produced from *Acheta domesticus* with fermentation, enzymatic and microwave-assisted extraction. *Sustainable Food Technology* 3: 277–285. <https://doi.org/10.1039/D4FB00263F>
- Rao, M.S., Muñoz, J. and Stevens, W.F., 2000. Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54: 808–813. <https://doi.org/10.1007/s002530000449>
- Shanmugam, A., Kathiresan, K. and Nayak, L., 2016. Preparation, characterization and antibacterial activity of chitosan and phosphorylated chitosan from cuttlebone of *Sepia kubiensis* (Hoyle, 1885). *Biotechnology Reports* 9: 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2015.10.007>
- Sheng, Z., Guo, A., Wang, J. and Chen, X., 2022. Preparation, physicochemical properties and antimicrobial activity of chitosan from fly pupae. *Heliyon* 8(8): e11168. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11168>
- Shin, C.-S., Kim, D.-Y. and Shin, W.-S., 2019. 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* 125: 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.242>
- Son, Y.-J., Hwang, I.-K., Nho, C.W., Kim, S.M. and Kim, S.H., 2021. Determination of carbohydrate composition in mealworm (*Tenebrio molitor* L.) larvae and characterization of mealworm chitin and chitosan. *Foods* 10: 640. <https://doi.org/10.3390/foods10030640>
- Song, Y.-S., Kim, M.-W., Moon, C., Seo, D.-J., Han, Y.S., Jo, Y.H., Noh, M.Y., Park, Y.-K., Kim, S.-A., Kim, Y.W. and Jung, W.-J., 2018. Extraction of chitin and chitosan from larval exuvium and whole body of edible mealworm, *Tenebrio molitor*. *Entomological Research* 48: 227–233. <https://doi.org/10.1111/1748-5967.12304>
- Soon, C.Y., Tee, Y.B., Tan, C.H., Rosnita, A.T. and Khalina, A., 2018. Extraction and physicochemical characterization of chitin and chitosan from *Zophobas morio* larvae in varying sodium hydroxide concentration. *International Journal of Biological Macromolecules* 108: 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.138>
- Tanga, C.M., Egonyu, J.P., Beesigamukama, D., Niassy, S., Kimathi, E., Magara, H.J.O., Omuse, E.R., Subramanian, S. and Ekesi, S., 2021. Edible insect farming as an emerging and profitable enterprise in East Africa. *Current Opinion in Insect Science* 48: 64-71. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2021.09.007>
- van Huis, A., van Itterbeeck, J., Klunder, H., Mertens, E., Halloran, A., Muir, G. and Vantomme, P., 2013. Edible insects: future prospects for food and feed security. FAO Forestry Paper 171. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, Italy, 187 pp.
- Yan, D., Li, Y., Liu, Y., Li, N., Zhang, X. and Yan, C., 2021. Antimicrobial properties of chitosan and chitosan derivatives in the treatment of enteric infections. *Molecules* 26(23): 7136. <https://doi.org/10.3390/molecules26237136>
- Zhatkanbayeva, Zh., Kurtibay, K., Zhatkanbayev, Ye., Kappassuly, A. and Fedeli, R., 2025. Chemical aspects of biomolecule extraction from *Zophobas morio* larvae: lipid and protein extraction mechanisms and solvent efficiency analysis. *Chemical Journal of Kazakhstan* 1(89): 150–159. <https://doi.org/10.51580/2025-1.2710-1185.15>

#### 4- Considerações finais

A presente dissertação atingiu o objetivo ao demonstrar a viabilidade técnica da extração, purificação e caracterização de quitina e quitosana a partir da biomassa de insetos, especificamente *Gryllus assimilis* e *Zophobas morio*, como fontes alternativas para a obtenção desses biopolímeros. Os resultados obtidos evidenciaram que tanto a eficiência dos processos de extração quanto a qualidade estrutural e funcional do biopolímero não são fatores isolados, mas sim o efeito direto da interação entre a metodologia de extração empregada e as características físico-químicas inerentes a cada espécie.

Ao comparar a eficiência dos diferentes métodos, constatou-se a clara superioridade das abordagens biotecnológicas — em especial a Extração Química Assistida por Enzima e a Química-Biológica. Essas vias mostraram-se determinantes para a preservação da integridade do polímero e para a superação de barreiras estruturais, como a elevada complexidade lipídica da biomassa larval de *Z. morio*, a qual restringe severamente o rendimento e a eficácia do método químico tradicional.

A avaliação *in vitro* confirmou o notável potencial biológico das quitosanas extraídas frente a patógenos de impacto global na aquicultura. Destaca-se o ineditismo e o desempenho superior da matriz de *G. assimilis*, que, quando submetida a rotas de extração mais limpas, originou biopolímeros com altíssima e generalizada atividade antibacteriana. Tais achados validam a hipótese de que a otimização da desacetilação por métodos assistidos reflete diretamente na potencialização da ação antimicrobiana.

Em conjunto, essas evidências sustentam a proposição inicial de que biopolímeros derivados de insetos constituem uma alternativa promissora para o desenvolvimento de estratégias profiláticas na produção animal. Dessa forma, os resultados desta dissertação contribuem para o avanço do conhecimento sobre fontes não convencionais de quitosana e reforçam o potencial de abordagens biotecnológicas na mitigação do uso de antibióticos na aquicultura, abrindo perspectivas para estudos futuros voltados à padronização e otimização dos processos e à avaliação *in vivo* desses biopolímeros.