

15º Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia do IFSP - 2024

APLICAÇÃO DE *Bacillus subtilis* 93 CULTIVADO EM EXÚVIA DE LARVAS DE *Tenebrio molitor* NO DESENVOLVIMENTO DE FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris*)

A. B. Q. AGUIAR¹, M. M. C. OLIVEIRA¹, M. P. BAGAGLI²

¹ Graduando em Engenharia de Biosistemas, IFSP, Campus Avaré, annabeatrizqueirozaguiar@gmail.com, maite.montanha@aluno.ifsp.edu.br.

² Docente do curso de Engenharia de Biosistemas, IFSP, Campus Avaré, marcela.bagagli@ifsp.edu.br.

Área de conhecimento (Tabela CNPq): 5.01.02.04-4 Microbiologia agrícola

RESUMO: Este trabalho teve como objetivo avaliar a aplicação de *Bacillus subtilis* 93 cultivados em material quitinoso de *T. molitor*, no desenvolvimento inicial de plantas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). Os extratos da fermentação em estado sólido da linhagem em questão, bem como o resíduo sólido desta fermentação, foram utilizados para tratar as sementes de feijão e no sulco de plantio, respectivamente, sendo acompanhado após 15 dias o índice de germinação, comprimento e volume das raízes e comprimento da parte aérea das plantas. A cepa em questão, embora tenha se desenvolvido bem no material quitinoso de *T. molitor* ($2,20 \times 10^9$ UFC.mL⁻¹), não apresentou efeito significativo, nas condições avaliadas, no desenvolvimento inicial das plantas de feijão. Já o resíduo sólido apresentou efeito positivo no volume das raízes das plantas, aumentando em 1,7 vezes em relação ao controle.

PALAVRAS-CHAVE: FES; Quitina; Bioinsumos.

APPLICATION OF *Bacillus subtilis* 93 CULTIVATED ON *Tenebrio molitor* LARVAL EXUVIAE IN THE DEVELOPMENT OF COMMON BEAN (*Phaseolus vulgaris*)

ABSTRACT: This study aimed to evaluate the application of *Bacillus subtilis* 93 cultivated on chitinous material from *T. molitor* in the initial development of common bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). Extracts from the solid-state fermentation of the strain in question, as well as the solid residue from this fermentation, were used to treat bean seeds and in the planting furrow, respectively. After 15 days, the germination index, root length and volume, and shoot length of the plants were monitored. The strain in question, although it developed well on the chitinous material from *T. molitor* (2.20×10^9 CFU.mL⁻¹), did not show a significant effect, under the evaluated conditions, on the initial development of the bean plants. However, the solid residue had a positive effect on the root volume of the plants, increasing it by 1.7 times compared to the control.

KEYWORDS: SSF; Chitin; Bioproducts.

INTRODUÇÃO

A Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2015) apresenta como alternativa sustentável para o fornecimento de proteínas para a população mundial crescente, o consumo de insetos. A criação massal de insetos para alimentação gera subprodutos que podem ser aplicados na obtenção de biocombustíveis e bioinsumos para a agricultura (Castro et al., 2018; Heyes, 2018; Fialho et al., 2021; Poveda, 2021).

As larvas de *Tenebrio molitor* foram as primeiras aprovadas para consumo humano na União Europeia (EFSA NDA Panel, 2021). Sua produção massal libera exúvias, constituídas por proteínas, quitina e minerais, como resíduos (Finke, 2007; Kim et al., 2014; Lin et al., 2021). A quitina e seus

derivados são associados ao desenvolvimento e rendimento de plantas (Chakraborty et al., 2020; Poveda, 2021), além de comporem a parede celular de fungos (Azevedo et al., 2007; Poveda, 2021).

Bacillus subtilis, uma bactéria amplamente utilizada no controle biológico de pragas e doenças, é produtor de enzimas quitinolíticas e proteolíticas por fermentações em estado sólido, as quais são importantes para sua ação fungicida (Fontes; Valadares-Inlis, 2020; Wang et al., 2021). Ainda, são produtores de substâncias promotoras de crescimento, solubilizadoras de minerais, e apresentam efeito benéfico na nodulação de leguminosas (Gaind; Gaur, 1991; Srinivasan et al., 1996; Luz, 2001; Lazzaretti; de Melo, 2005).

Desta forma, este trabalho almejou aplicar o material quitinoso proveniente de exúvias de larvas de *Tenebrio molitor* como substrato para o cultivo em estado sólido de *Bacillus subtilis*, a fim de se obter bioinsumo com atividade de quitinase e proteases, quantidade significativa de esporos, bem como com capacidade de aprimorar o desenvolvimento inicial de feijoeiros (*Phaseolus vulgaris*) e neste caso, foram avaliadas o material extraído do meio fermentado e o resíduo sólido da extração.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo do material quitinoso

O material quitinoso proveniente do cultivo de larvas de *T. molitor* foi doado pela empresa AGRIN - Criação e Comércio de Insetos. Esse material foi seco em estufa de circulação forçada de ar, a 70 °C até peso constante. Em seguida, o material foi triturado em moinho multiuso e passado por peneira com abertura de 600 µm, sendo armazenado em embalagens plásticas a -18 °C até o momento de uso.

A capacidade de retenção de água do material quitinoso foi avaliada pesando 1g do material em Tubo falcon de 15 mL de fundo cônico com pequenos furos, sendo estes acoplados à uma proveta de 10 mL. Em seguida foram adicionados 7,5 mL de água destilada ao material e foi coletado o líquido nas provetas por 24 h (adaptado de Müller, 1964). Após o período, foi quantificada a capacidade de retenção de água pelo material (CR). O ensaio foi realizado em triplicata.

Preparo dos inóculos para as fermentações

A cepa de *Bacillus subtilis* 93 (Bs) foi gentilmente cedida pelo laboratório de bioquímica de alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos (UNICAMP – Campinas). O microrganismo foi em *slants* de ágar nutriente, recoberto por vaselina líquida sob refrigeração (5 °C), sendo repicado a cada 6 meses.

Para a produção dos inóculo de Bs, placas de Petri contendo ágar nutriente foram recobertas com o microrganismo, utilizando técnica de recobrimento para obtenção de crescimento confluyente, utilizando *swab* estéril para o estriamento. As placas foram incubadas a 28 °C por 48 h.

Cultivo dos microrganismos no material quitinoso por fermentação em estado sólido.

O material quitinoso foi umedecido com água destilada na quantidade indicada pela CR, homogeneizado e transferido para frascos Erlenmeyer de 250mL (18 g cada). Os frascos foram autoclavados a 121°C por 15 minutos. Após o resfriamento, foram inoculados com 3 cilindros de ágar, de 0,6 cm de diâmetro, com a superfície completamente recoberta pelo microrganismo de interesse, e incubados por 240 h, a 28 °C.

Extração de enzimas extracelulares e microrganismos

Após o período de incubação foi realizada a extração das enzimas extracelulares produzidas e microrganismos. Para tanto, adicionou-se 50 mL de água destilada aos meios de cultivo, o qual foi homogeneizado com bastão de vidro e agitado a 200 rpm por 40 minutos a 28 °C. O extrato foi, então, filtrado utilizando funil e gaze estéril para remoção de sólidos. O filtrado foi denominado de extrato fermentado bruto (EFB Q) o qual foi mantido a -18 °C até o momento da análise. Fracos contendo apenas o substrato foram extraídos sem a presença de microrganismos, sendo utilizado como controle para os ensaios (EFB C). A fração sólida foi coletada, seca em estufa a 50 °C por 24h e armazenado a -18 °C até o momento da análise, sendo denominados de produto fermentado bruto (PFB Q e PFB C).

Os extratos enzimáticos foram avaliados em relação à produção de proteases, quitinases e contagem de esporos.

Quantificação de esporos de bactérias nos EFB

A contagem de esporos de *Bacillus* foi realizada de acordo com o proposto por Monnerat *et al.* (2020), com modificações, sendo que uma alíquota de 1,5 mL da amostra, sem diluição, foi transferida para um tubo Eppendorf e submetido à choque térmico em banho maria a 80 °C por 12 minutos seguido de banho de gelo por 5 minutos, a fim de eliminar células vegetativas e manter apenas os esporos. Em seguida, foram feitas diluições decimais seriadas da amostra, em tubos contendo solução salina (0,85% m:v) estéril com 0,05% (m:v) de polisorbato 80. Foram semeados 100 µL da diluição desejada em 2 placas de Petri contendo meio Embrapa sólido. As placas foram mantidas em estufa a 28 °C por 48 h e foram, então, contadas as unidades formadoras de colônias. O cálculo da quantidade de unidades formadoras de colônia por mL de amostra foi calculado pela equação 1.

$$\text{Esporos} \left(\frac{\text{UFC}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{número médio de colônias nas placas} \times \text{fator de diluição}}{\text{volume de amostra semeado (mL)}} \quad (\text{eq1})$$

Quantificação da atividade proteolítica nos EFB

A atividade de proteases foi determinada utilizando como substrato da reação enzimática a azocaseína, de acordo com Charney e Tomarelli (1947), com modificações. A mistura reacional contendo 0,5 mL de azocaseína (Sigma) 0,5% (m:v), pH 7,0, e 0,5 mL de solução enzimática, previamente diluída, foi incubada por 40 minutos a 50 °C. A reação foi, então, paralisada com a adição de 0,5 mL de TCA 10 % (m:v) e a mistura centrifugada a 10000 rpm por 15 minutos, 20 °C. Uma alíquota de 1,0 mL do sobrenadante foi, então, neutralizado com 1,0 mL de KOH 5 M. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorbância a 428 nm de 0,01 nas condições experimentais.

Quantificação da atividade quitinolítica nos EFB.

A quantificação de quitinases foi realizada de acordo com Schmaltz (2020). A reação enzimática foi conduzida em tubos plásticos de 5 mL contendo 500 µL de solução 1% de quitina de crustáceo coloidal em tampão acetato 50 mM em pH 7,0 e 500 µL de solução enzimática (previamente diluída), sendo incubados a 40°C por 1 hora, sendo a reação paralisada em banho de gelo. Na sequência, foi realizada a quantificação dos açúcares redutores pelo método de DNS (Miller, 1959), utilizando N-acetilglucosamina como padrão. Um controle foi preparado paralisando a reação com o DNS logo no início da reação enzimática. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de N-acetilglucosamina por mL por minuto de reação.

Análise do efeito dos EFB e dos PFB no tratamento das sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)

Os EFB foram utilizados para tratamento das sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), adquiridas em comércio local, sendo colocadas em sacos plásticos com capacidade para 1 Kg, adicionadas de 2,0 mL do EFB para cada 300 g de sementes. Os sacos foram fechados e agitados vigorosamente para homogeneização por cerca de 2 minutos. Em seguida foram colocados em bandejas plásticas e secos em temperatura ambiente por 2 h. Água destilada foi utilizada como controle. Os ensaios foram realizados em duplicata.

As sementes tratadas com os EFB de *Bacillus subtilis* e água destilada, foram cultivadas em bandejas para mudas, com substratos úmido, sendo plantadas 25 sementes a 3 cm de profundidade para cada ensaio. As bandejas ficaram na estufa e foram irrigadas 3 vezes por dia, por um período de 15 dias, sendo quantificado o índice de germinação (plântulas 2 mm acima do substrato), o comprimento da parte aérea e da raiz, além do volume das raízes (por deslocamento de coluna d'água).

Os produtos fermentados brutos (PFB) foram aplicados durante o plantio do feijão em vasos de 1 litro contendo substrato úmido. Em cada tratamento, exceto no tratamento com água, foram plantadas 25 sementes juntamente com 0,24 g de PFB a uma profundidade de 5 cm. No tratamento com água, apenas as sementes foram plantadas. Os vasos permaneceram na estufa por um período de 15 dias, sendo irrigados três vezes ao dia, por fim foram quantificados o índice de germinação, o volume das raízes e o comprimento da parte aérea.

Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas através da ANOVA de um fator, com auxílio do software R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) versão 4.1.0, sendo realizadas comparação de médias pelo teste Tukey com 95% de confiança. A quantidade de plantas ou germinação foi avaliada pelo teste Qui-quadrado com o mesmo nível de confiança.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Capacidade de retenção de água do material quitinoso

A capacidade de retenção de água pelo material quitinoso foi, em média, de $2,9 \pm 1,2 \text{ mL.g}^{-1}$. Desta forma, para cada 1 g de material quitinoso, foram adicionados 2,9 mL de água.

Avaliação das fermentações

A contagem de esporos de *B. subtilis* nos EFB se mostrou satisfatória visto que foram, em média, de $2,20 \times 10^9 \text{ UFC.mL}^{-1}$ de EFB. O extrato obtido dos ensaios que não receberam o inóculo não apresentaram contagem de esporos de *Bacillus*, indicando que não houve contaminação e que a esterilização foi eficiente.

Avaliação da atividade proteolítica e quitinolítica nos EFB

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos para a atividade proteolítica e quitinolítica do EFB de *B. subtilis* e do controle.

TABELA 1. Atividade proteolítica e quitinolítica dos EFB Controle e de *Bacillus subtilis*. Letras sobrescritas diferentes indicam que houve diferença significativa entre as amostras pelo teste Tukey com 95% de confiança.

Ensaio	Atividade Proteolítica (U.g ⁻¹ de substrato seco)	Atividade Quitinolítica (U.Kg ⁻¹ de substrato seco)
EFB C	$16,64 \pm 1,61^b$	$1,86 \pm 0,26$
EFB Q	$29,70 \pm 0,28^a$	$36,31 \pm 7,27^a$

Avaliação dos EFB no desenvolvimento inicial de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.)

O índice de germinação bem como o volume da raiz e comprimentos da raiz e parte aérea, médios, medidos após 15 dias de cultivo das sementes tratadas com água (controle), com o EFB Controle e EFB *B. subtilis* estão apresentados na Tabela 2.

TABELA 2. Índice de germinação (%), volume da raiz (mL), comprimento a raiz (cm) e comprimento da parte aérea (cm) de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) tratadas com água (controle), com o EFB Controle e EFB *B. subtilis*. Letras sobrescritas diferentes indicam que houve diferença significativa entre as amostras pelo teste Chi-quadrado para índice de germinação e Tukey para as demais, com 95% de confiança. As análises foram realizadas por variável resposta.

Ensaio	Índice de germinação (%)	Volume da raiz (mL)	Comprimento da raiz (cm)	Comprimento parte aérea (cm)
EFB C	70 ^a	$1,80 \pm 0,10^a$	$14,53 \pm 1,53^a$	$8,71 \pm 0,97^a$
EFB Q	62 ^a	$1,75 \pm 0,10^a$	$15,01 \pm 1,37^a$	$8,61 \pm 0,97^a$
Controle	68 ^a	$1,69 \pm 0,10^a$	$14,31 \pm 1,77^a$	$8,51 \pm 1,01^b$

A aplicação dos EFB não apresentou efeito significativo nos parâmetros avaliados, sendo que na concentração avaliada, o *B. subtilis* 93 não pode ser considerado com um provável agente de melhoria do desenvolvimento inicial do feijão.

Resultado similar foi observado por Lazzaretti e de Melo (2005) para a linhagem *B. subtilis* OG. No entanto, Lastochkina et al. (2021) avaliaram linhagens endofíticas de *B. subtilis* na germinação de feijões, sendo observado que duas delas aumentaram o índice de germinação de 1,3 a 2% em condições normais, e de 15 a 72 % em condições de salinidade de solo de 1%. Ainda promoveram o aumento do comprimento das raízes e partes aéreas das plantas após 8 dias da semeadura.

Avaliação dos PFB no desenvolvimento inicial de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.)

O índice de germinação, volume da raiz e comprimentos da raiz e parte aérea, médios, medidos após 15 dias de cultivo dos vasos onde foram adicionados PFB Q ou PFB C durante o plantio, bem como o controle sem adições, estão apresentados na Tabela 3.

TABELA 3. Índice de germinação (%), volume da raiz (mL), comprimento a raiz (cm) e comprimento da parte aérea (cm) para o cultivo de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) nos tratamentos controle, com PFB Q e PFB C. Letras sobrescritas diferentes indicam que houve diferença significativa entre as amostras pelo teste Chi-quadrado para índice de germinação e Tukey para as demais, com 95% de confiança. As análises foram realizadas por variável resposta.

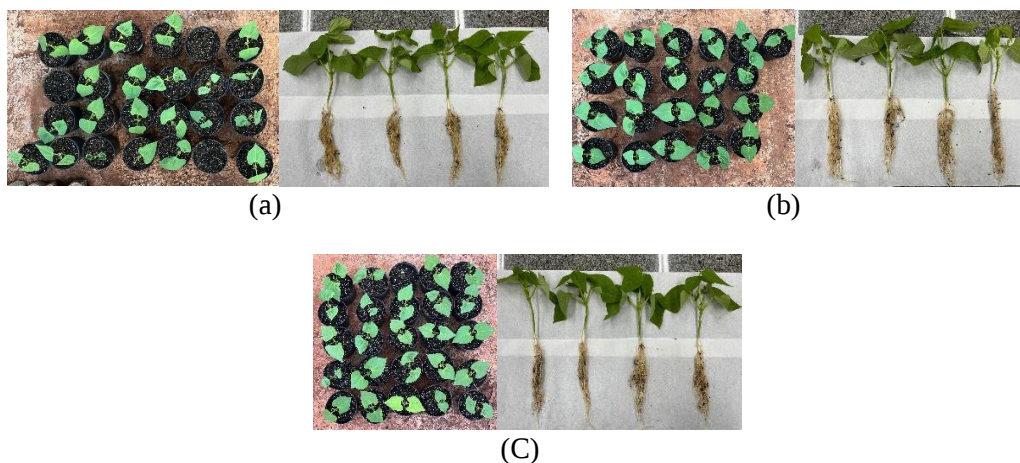
Ensaio	Índice de germinação (%)	Volume da raiz (mL)	Comprimento da raiz (cm)	Comprimento parte aérea (cm)
PFB C	92 ^a	4,04 ± 1,15 ^b	25,61 ± 4,35 ^a	13,76 ± 1,75 ^a
PFB Q	100 ^a	5,48 ± 1,08 ^a	24,41 ± 3,15 ^a	14,43 ± 1,76 ^a
Controle	86 ^a	3,19 ± 1,29 ^c	24,91 ± 5,55 ^a	12,06 ± 2,48 ^b

A aplicação dos PFB, diferente do EFB, apresentou efeito significativo no aumento do volume da raiz das plantas de feijão, sendo que para o PFB Q houve um aumento de 1,7 vezes em relação ao controle. Em relação ao comprimento das raízes, não houve diferenças significativas entre os tratamentos. O crescimento e desenvolvimento do sistema radicular dos feijões é importante para a sustentação das plantas e para que explorem eficientemente o solo (de Cézaro, 2018).

O comprimento da parte aérea para os PFB Q e PFB C foram diferentes do controle, mas não entre si, com 95% de confiança, sugerindo que para este parâmetro, o material quitinoso em si possa apresentar resultados significativos.

Estes resultados apontam que o material quitinoso fermentado por *B. subtilis* 93, residual da extração aquosa dos microrganismos e metabólitos extracelulares, pode contribuir positivamente com o desenvolvimento inicial de plantas do feijoeiro, sendo um destino mais nobre que o descarte do material.

FIGURA 1. Plantas tratadas com PFB em estufa e análises de comprimento, respectivamente. a) PFB C, b) PFB Q e c) Água



CONCLUSÕES

Embora o *B. subtilis* 93 tenha apresentado bom desenvolvimento nas exúvias de *T. molitor*, com o extrato fermentado bruto atingindo contagens satisfatórias para tratamento de sementes, e apresentando atividade proteolítica e quitinolítica, não houve efeito deste microrganismo no início do desenvolvimento de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). No entanto, este estudo não inviabiliza a aplicação deste microrganismos como agente microbiano de controle de pragas e doenças.

O material sólido fermentado, remanescente do processo de extração do bioinsumo a base de *B. subtilis* produzido por fermentação em estado sólido, um resíduo da produção, apresentaram efeito positivo no volume das raízes das plantas do feijoeiro, favorecendo sua aplicação na agricultura.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

A.B.Q.A. e M.M.C.O. procederam com a metodologia e experimentos. Todos os autores contribuíram com a redação e revisão do trabalho e aprovaram a versão submetida.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao IFSP pela estrutura e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS

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

Baldoni, D.B., Antonioli, Z.I., Mazutti, M.A. *et al.* Chitinase production by *Trichoderma koningiopsis* UFSMQ40 using solid state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, p. 1897–1908, 2020.

Brasil. Instrução Normativa SDA nº 36, de 13 de dezembro de 2019. Dispõe sobre a especificação de referência para produtos fitossanitários com uso aprovado na agricultura orgânica. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 17 de dezembro de 2019.

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

CHAKRABORTY, M.; HASANUZZAMAN, M.; RAHMAN, M.; KHAN, A.R.; BHOWMIK, P.; MAHMUD, N.U.; TANVEER, M.; ISLAM, T. Mechanism of p promotion and disease supression by chitosan biopolymer. **Agriculture**, v. 10, n.624, 2020. Doi: <https://doi.org/10.3390/ag>

CHARNEY J.; TOMARELLI R. M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **Journal Biological Chemistry**, v. 1 505, 1947.

DE CÉZARO, Eduardo Eloi. **Caracterização do sistema radicular de cultivares de feijão**. Trabalho de conclusão de curso (Agronomia). Pato Branco. UTFPR, 2018. 62p.

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

FIALHO, A.T.S.; SILVA, A.S.; BRITO, C.O.; VALE, P.A.C.B.; OLIVEIRA, C.J.P.; RIBEIRO JUNIOR, V. Nutricional composition of larvae of mealworm (*Tenebrio* and crickets (*Gryllus assimilis*) with potential usage in feed. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.73, n.2, p.539-542, 2021.

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

FLEURI, L.F.; SATO, H.H. Estudo da influência de diferentes parâmetros na produção de enzimas líticas. **Ciência e Tecnologia de alimentos**, v. 28, n.2; p. 299-310, 2008.

LASTOCHKINA, O.; ALINIAEIFARD, S.; GARSHINA, D.; GARIPOVA, S.; PUSENKOVA, L.; ALLAGULOVA, C.; FEDOROVA, K.; BAYMIEV, A.; KORYAKOV, I.; SOBHANI, M. Seed priming with endophytic *Bacillus subtilis* strain-specifically improves growth of *Phaseolus vulgaris* plants under normal and salinity conditions and exerts anti-stress effect through induced lignina

deposition in roots and decreased oxidative and osmotic damages. **Journal of plant physiology**, v. 263, 2021.

LAZZARETTI, E.; DE MELO, I.S. **Influência de *Bacillus subtilis* na promoção de crescimento de plantas e nodulação de raízes de feijoeiro**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2005.

MILLER, Gail Lorenz. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

FONTES, E.M.G.; VALADARES-INGLIS, M.C. **Controle biológico de pragas da agricultura**. Brasília, DF: Embrapa, 2020. 510p.

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

KIM, S.G.; KIM, J.E.; OH H.K.; KANG, S.J.; KOO, H.Y.; KIM, H.J.; CHOI, H.C.; SUN, S.S. Feed supplementation of yellow mealworms (*Tenebrio molitor* L.) imp characteristics and meat quality in broiler. **J. Agric. Sci. Technol.**, v.49, n. 9, p. 18, 2014. Doi: <https://doi.org/10.29335/tals.2014.49.9>.

LIN Y-S, LIANG S-H, LAI W-L, LEE J-X, WANG Y-P, LIU Y-T, WANG S-H, LEE M-H. Sustainable Extraction of Chitin from Spent Pupal Shell of Black Soldier Fly. 9(6):976, 2021. <https://doi.org/10.3390/pr9060976>

MACIEL, Gleidson Luquezi. **Fermentação de material quitinoso residual da criação de larvas de BSF (*Hermetia illucens*) para obtenção de enzimas quitinolíticas e proteolíticas**. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Biosistemas) – Instituto Federal de São Paulo, Avaré, São Paulo, 2023.

MATTEDI, Alessandro; *et al.*; **Solid-State Fermentation: Applications and Future Perspectives for Biostimulant and Biopesticides Production**. *Microorganisms*, v.11, 1408, 2023.

MILLER, Gail Lorenz. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

POVEDA, J. Insect frass in the development of sustainable agriculture. A review. **Agronomy for sustainable development**, v.41, n.5, <https://doi.org/10.1007/s13593-020-00656-x>.

SALA, A.; ECHEGARAY, T.; PALOMAS, G.; BOGGIONE, M.J.; TUBIO, G.; BARRENA, R. Insights on fungal solid-state fermentation for waste valorization: C chitinase production in different reactor configurations. **Sustainable chemistry and pharmacy**, 26, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2022.100624>

SURESH, P.V.; CHANDRASEKARAN, M. Impact of process parameters on chitinase production by an alkalophilic marine *Beauveria bassiana* in solid state fer **Process biochemistry**, 34:257-267, 1999. [https://doi.org/10.1016/s0032-9592\(98\)00092-2](https://doi.org/10.1016/s0032-9592(98)00092-2).

WANG, D.; LI, A.; HAN, H.; LIU, T.; YANG, Q. A potent chitinase from *Bacillus subtilis* for the efficient bioconversion of chitin-containing wastes. **Inte. J. Biol. Ma** 116, p. 863-868, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.122>