

**LÍVYA ALVES OLIVEIRA**

**CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL DE FARINHAS DE INSETOS COM  
POTENCIAL DE UTILIZAÇÃO NA ALIMENTAÇÃO HUMANA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das Exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Ceres Mattos Della Lucia

Coorientadores: Hércia Stampini Duarte Martino  
Barbara Pereira da Silva  
Eugênio Eduardo de Oliveira

**VIÇOSA – MINAS GERAIS  
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

O48c  
2022

Oliveira, Lívyá Alves, 1996-

Caracterização nutricional de farinhas de insetos com potencial de utilização na alimentação humana / Lívyá Alves Oliveira. – Viçosa, MG, 2022.

1 dissertação eletrônica (100 f.): il. (algumas color.).

Texto em português e inglês.

Orientador: Ceres Mattos Della Lucia.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Nutrição e Saúde, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.710>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Insetos comestíveis. 2. Proteínas na nutrição humana. 3. Aminoácidos na nutrição. 4. Compostos bioativos. I. Della Lucia, Ceres Mattos, 1984-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Nutrição e Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição. III. Título.

CDD 22. ed. 641.396

Bibliotecário(a) responsável: Euzébio Luiz Pinto CRB-6/3317

**LÍVYA ALVES OLIVEIRA**

**CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL DE FARINHAS DE INSETOS COM  
POTENCIAL DE UTILIZAÇÃO NA ALIMENTAÇÃO HUMANA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das Exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 29 de agosto de 2022.

Assentimento:

---

Lívyá Alves Oliveira  
Autora

---

Ceres Mattos Della Lucia  
Orientadora

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me abençoar durante esse caminho, e por colocar em minha vida pessoas que foram essenciais nesse processo. Aos meus pais, Sandro e Any, minha irmã, Ana Flávia, e ao Samir por todo apoio e por sempre estarem ao meu lado. Agradeço imensamente a minha orientadora e amiga Ceres, por todos os ensinamentos, confiança, disponibilidade e ombro amigo. À toda equipe do Laboratório de Análises de Vitaminas, e aqueles que por lá já passaram e deixaram um pouquinho de si. Aos meus coorientadores e aos integrantes do Laboratório de Nutrição Experimental e Laboratório de Fisiologia e Neurobiologia de Invertebrados, pela disponibilidade, parceria e partilha de conhecimentos. Agradeço à banca examinadora pelo aceite do convite. Agradeço também aos amigos, por tornarem essa trajetória mais bonita e alegre, e a todos os familiares, que sempre torceram pelo meu sucesso. Agradeço à Universidade Federal de Viçosa, por transformar minha vida com todas as oportunidades que me proporcionou desde que aqui cheguei. Ao programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, por tornar esse sonho possível. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo financiamento do projeto.

Muito obrigada a todos que, de alguma forma, contribuíram para que eu chegasse até aqui e para que meu trabalho fosse mais completo.

## RESUMO

OLIVEIRA, Lívya Alves, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2022. **Caracterização nutricional de farinhas de insetos comestíveis com potencial de uso na alimentação humana.** Orientadora: Ceres Mattos Della Lucia. Coorientadores: Hércia Stampini Duarte Martino, Barbara Pereira da Silva e Eugênio Eduardo de Oliveira.

Diante de projeções de crescimento acelerado da população global, estima-se que a demanda mundial por proteínas deverá dobrar até o ano de 2050. Nesse cenário, questões sobre modos de produção de alimentos de qualidade e em quantidade suficiente tornam-se pautas contra o enfrentamento da insegurança alimentar e nutricional. O potencial de insetos comestíveis como novo ingrediente tem sido investigado como alternativa às fontes convencionais de proteínas. O objetivo deste estudo foi revisar sistematicamente estudos *in vivo* que avaliaram a qualidade proteica de insetos e desenvolver e caracterizar farinhas de insetos comestíveis (*Tenebrio molitor*, *Gryllus assimilis*, *Belostoma anurum*) com potencial de uso na alimentação humana. Para avaliar a influência do estágio de maturação no conteúdo nutricional dos insetos, as farinhas de *Tenebrio molitor* e *Gryllus assimilis* foram produzidas em dois estágios de desenvolvimento. As farinhas foram analisadas quanto a sua composição centesimal, conteúdo de minerais, atividade antioxidante, compostos fenólicos, carotenoides, vitaminas C e E, riboflavina, niacina, perfil de aminoácidos, digestibilidade proteica *in vitro* e solubilidade em função do pH. A partir da revisão sistemática, foi possível observar que, devido à alta heterogeneidade dos resultados não se pode concluir que os insetos apresentam alta qualidade proteica, embora tenham sido encontrados resultados positivos quanto ao valor biológico da proteína. As farinhas desenvolvidas mostraram-se fontes de proteínas, fósforo, cobre, ferro, zinco, manganês. As farinhas desenvolvidas a partir das três espécies atenderam às exigências de histidina, treonina, aminoácidos sulfurados e aminoácidos aromáticos, entretanto, a lisina foi o aminoácido limitante em suas composições. As proteínas das farinhas de *Tenebrio molitor* e *Gryllus assimilis* apresentaram boa digestibilidade e maior solubilidade em pH alcalino. O estágio de desenvolvimento dos insetos foi capaz de influenciar seu conteúdo nutricional, perfil de aminoácidos e propriedades funcionais da proteína, sendo o *Gryllus assimilis* adulto e a pupa de *Tenebrio molitor* com resultados superiores em relação às ninfas e larvas das respectivas espécies. Diante do exposto, a utilização de farinhas de insetos pode ser considerada pela indústria de alimentos com o objetivo de agregar valor nutricional a produtos e preparações.

**Palavras-chave:** Entomofagia. Insetos comestíveis. Digestibilidade proteica. Aminoácidos. Compostos bioativos.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, Lívyia Alves, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August 2022. **Nutritional characterization of edible insect flour with potential for use in human food.** Adviser: Ceres Mattos Della Lucia. Co-advisers: Hércia Stampini Duarte Martino, Barbara Pereira da Silva and Eugênio Eduardo de Oliveira.

Faced with projections of accelerated growth of the global population, it is estimated that the world demand for proteins will double by the year 2050. In this scenario, questions about ways of producing quality food and in sufficient quantity become guidelines against confronting of food and nutrition insecurity. The potential of edible insects as a new ingredient has been investigated as an alternative to conventional protein sources. The objective of this study was to systematically review in vivo studies that evaluated the protein quality of insects and to develop and characterize edible insect flours (*Tenebrio molitor*, *Gryllus assimilis*, *Belostoma anurum*) with potential use in human food. To evaluate the influence of maturation stage on the nutritional content of insects, *Tenebrio molitor* and *Gryllus assimilis* flours were produced in two stages of development. The flours were analyzed for their centesimal composition, mineral content, antioxidant activity, phenolic compounds, carotenoids, vitamins C and E, riboflavin, niacin, amino acid profile, in vitro protein digestibility and solubility as a function of pH. From the systematic review, it was possible to observe that, due to the high heterogeneity of the results, it cannot be concluded that the insects have high protein quality, although positive results were found regarding the biological value of the protein. The flours developed proved to be sources of protein, phosphorus, copper, iron, zinc, manganese. The flours developed from the three species met the requirements of histidine, threonine, sulfur amino acids and aromatic amino acids, however, lysine was the limiting amino acid in their compositions. Proteins from *Tenebrio molitor* and *Gryllus assimilis* flours showed good digestibility and higher solubility at alkaline pH. The developmental stage of the insects was able to influence their nutritional content, amino acid profile and functional properties of the protein, with the adult *Gryllus assimilis* and the pupa of *Tenebrio molitor* with superior results in relation to the nymphs and larvae of the respective species. Given the above, the use of insect flour can be considered by the food industry in order to add nutritional value to products and preparations.

**Keywords:** Entomophagy. Edible insects. Protein digestibility. Amino acids. Bioactive compounds.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> <i>Gryllus assimilis</i> .....	19
<b>Figura 2.</b> Ciclo de vida do <i>Tenebrio molitor</i> em seus estágios: (A) larva, (B) pupa e (C) adulto.....	20
<b>Figura 3.</b> <i>Belostoma anurum</i> .....	21

### Artigo 1:

<b>Figura 1.</b> Flow diagram of the systematic review literature search results.....	42
<b>Figura 2.</b> Risk of bias summary: review of authors' judgments about the risk of bias item for each included study.....	51
<b>Figura 3.</b> Impacts of using edible insects as a protein source in an animal model.....	52

### Artigo 2:

<b>Figura 1.</b> Fluxograma de obtenção das farinhas de inseto.....	67
<b>Figura 2.</b> Farinhas de <i>Gryllus assimilis</i> e <i>Tenebrio molitor</i> em dois estágios de desenvolvimento.....	72
<b>Figura 3.</b> Digestibilidade proteica e grau de hidrólise após a digestão enzimática (B) de farinhas de <i>Tenebrio molitor</i> e <i>Gryllus assimilis</i> em dois estágios de desenvolvimento.....	78
<b>Figura 4.</b> Solubilidade proteica de farinhas de <i>Tenebrio molitor</i> e <i>Gryllus assimilis</i> em dois estágios de desenvolvimento.....	79
<b>Figura 6.</b> SDS-PAGE de farinhas de insetos comestíveis em dois estágios de desenvolvimento e de seus extratos após a digestão enzimática.....	80

### Artigo 3:

<b>Figura 1.</b> Fluxograma de obtenção da farinha de <i>Belostoma anurum</i> .....	91
---	----

## LISTA DE TABELAS

### Artigo 1:

<b>Tabela 1.</b> PICOS criteria for the inclusion of studies.....	40
<b>Tabela 2.</b> Characteristics of the studies included.....	45
<b>Tabela S1:</b> Full search strategy in PubMed, Scopus, Web of Science and Embase.....	62

### Artigo 2:

<b>Tabela 1.</b> Composição centesimal de farinhas de <i>Gryllus assimilis</i> e <i>Tenebrio molitor</i> em dois estágios de desenvolvimento.....	73
<b>Tabela 2.</b> Composição dos elementos químicos de farinhas de <i>Gryllus assimilis</i> e <i>Tenebrio molitor</i> em dois estágios de desenvolvimento.....	73
<b>Tabela 3.</b> Ocorrência e concentração de vitamina C, vitamina E, carotenoides, riboflavina, niacina, compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante de farinhas de <i>Gryllus assimilis</i> e <i>Tenebrio molitor</i> em dois estágios de desenvolvimento.....	74
<b>Tabela 4.</b> Potencial de contribuição das farinhas de <i>Gryllus assimilis</i> e <i>Tenebrio molitor</i> em dois estágios de desenvolvimento para o suprimento das recomendações diárias de nutrientes para mulheres e homens na faixa etária de 19 a 59 anos, em uma porção estipulada de 50g.....	75
<b>Tabela 5.</b> Perfil de aminoácidos de farinhas de larva de <i>Gryllus assimilis</i> e <i>Tenebrio molitor</i> em dois estágios de desenvolvimento.....	76
<b>Tabela 6.</b> Escore de aminoácidos essenciais de farinhas de <i>Gryllus assimilis</i> e <i>Tenebrio molitor</i> em dois estágios de desenvolvimento com base nos padrões de requerimento da FAO para adultos.....	77

### Artigo 3:

<b>Tabela 1.</b> Composição centesimal e elementos químicos de farinha de <i>Belostoma anurum</i> .....	93
<b>Tabela 2.</b> Potencial de contribuição de farinha de <i>Belostoma anurum</i> para o suprimento das recomendações diárias de nutrientes para mulheres e homens na faixa etária de 19 a 59 anos, em uma porção estipulada de 50g.....	94
<b>Tabela 3.</b> Perfil de aminoácidos da farinha de <i>Belostoma anurum</i> .....	94
<b>Tabela 4.</b> Escore químico de aminoácidos essenciais de farinha de <i>Belostoma anurum</i> com base nos padrões de requerimento da FAO aminoácidos para adultos.....	95

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA: Análise de variância

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

DAD: Detector de arranjo de diodos

DPPH: 2,2-difenil-2-picril-hidrazil

DRI: *Dietary Reference Intake*

g: Grama

GA: *Gryllus assimilis* adulto

GAE: Equivalentes de ácido gálico

GH: grau de hidrólise

GN: *Gryllus assimilis* ninfa

HPLC: *High performance liquid chromatography*

Kcal: Quilocaloria

L: Litro

M: Molar

mg: Miligrama

mM: Milimolar

N: normal

pH: Potencial hidrogeniônico

rpm: Rotações por minuto

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio

TL: *Tenebrio molitor* larva

TP: *Tenebrio molitor* pupa

VET: Valor energético total

vs: Versus

μL: Microlitro

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 OBJETIVOS.....	13
2.1 Objetivo geral .....	13
2.2 Objetivos específicos.....	13
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
3.1 Entomofagia: histórico e importância.....	14
3.2 Aspectos nutricionais.....	15
3.3 Entomofagia e segurança alimentar e nutricional.....	17
3.5 Entomofagia e sustentabilidade .....	17
3.6 <i>Gryllus assimilis</i> .....	18
3.7 <i>Tenebrio molitor</i> .....	20
3.8 <i>Belostoma anurum</i> .....	20
4 METODOLOGIA GERAL .....	22
4.1 Insetos utilizados .....	22
4.2 Obtenção das farinhas de insetos.....	22
4.3 Determinação da composição centesimal.....	23
4.3.1 Determinação da umidade .....	23
4.3.2 <i>Determinação de lipídios</i> .....	23
4.3.3 Determinação de cinzas totais .....	24
4.3.4 Determinação de proteínas .....	24
4.3.5 Cálculo de carboidratos .....	25
4.3.6 Cálculo da densidade calórica .....	25
4.4 Determinação da ocorrência e concentração de minerais.....	25
4.5 Investigação da ocorrência e concentração de vitaminas .....	26
4.5.1 Vitamina C.....	26
4.5.2 Vitamina E.....	26
4.5.3 Carotenoides .....	27
4.5.4 Riboflavina .....	28
4.5.5 Niacina (B <sub>3</sub> ).....	28
4.6 Potencial de contribuição segundo a recomendação diária de nutrientes.....	28
4.7. Determinação dos compostos fenólicos totais.....	29
4.7.1 Obtenção dos extratos.....	29
4.7.2 Estimativa da concentração de fenólicos totais .....	29

4.7.3 Determinação da capacidade antioxidante .....	29
4.8 Determinação e quantificação de aminoácidos .....	30
4.9 Digestibilidade proteica <i>in vitro</i> .....	30
4.10 Grau de hidrólise .....	30
4.11 Determinação do perfil das proteínas .....	31
4.12 Solubilidade proteica em função do pH .....	31
4.13 Análises estatísticas .....	31
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	32
6 RESULTADOS .....	38
6.1 ARTIGO 1 .....	38
6.2 ARTIGO 2 .....	65
6.3 ARTIGO 3 .....	89
7 CONCLUSÃO GERAL .....	100

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de insetos na alimentação humana é definido como entomofagia (LUCAS et al., 2020). Apesar de não ser uma prática comum entre os países ocidentais, o ato de comer insetos tem início nos primórdios da humanidade e faz parte da dieta da população de, aproximadamente, 113 países ao redor do mundo (BARENNE et al., 2015). Essa cultura é predominante em partes da Ásia, África e América Latina, com mais de 2.100 espécies catalogadas como comestíveis (JONGEMA, 2017).

Há, em todo o mundo, questões iminentes em torno da produção de alimentos de forma sustentável e em quantidade suficiente para alimentar toda a população mundial. Estudos demográficos apontam aumento da população mundial para 9,6 bilhões até 2050 (ONU, 2013), associado a uma redução na disponibilidade de terras férteis para o desenvolvimento agrícola e produção de alimentos (MITSUHASHI, 2010).

A Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas (FAO) (2013) considera os insetos uma potencial fonte alimentar para responder às preocupações globais de segurança alimentar e incentiva a ampliação de seu uso na alimentação. Os insetos representam um meio alternativo de fornecer proteína para a alimentação humana, o que auxilia na promoção da segurança alimentar à medida que a necessidade de alimentos e, especialmente, de proteínas, aumenta em um mundo cada vez mais povoado (VAN HUIS, 2013).

Os sistemas de produção de carne requerem elevada quantidade de terra, energia e água, contribuem para a poluição do solo e das águas subterrâneas e emitem grandes quantidades de gases de efeito estufa (BHAT et al., 2015). Em comparação com animais produtores de proteínas convencionais, como gado, porcos e aves, os insetos podem fornecer a quantidade equivalente de proteína animal usando menos terra e água, além de produzir níveis muito mais baixos de gases de efeito estufa e, por isso, são considerados fontes de proteína ambientalmente sustentável (OONINCX et al., 2010). Além disso, os insetos possuem tempos de desenvolvimento curtos em comparação com os animais de produção tradicionais e exigem pouco espaço para uma produção de alto rendimento, o que torna sua produção comercial uma indústria crescente de alto valor econômico (JENSEN et al., 2017).

A popularização da entomofagia também representa grande interesse quando se trata de sua composição nutricional. O elevado conteúdo de proteína nos insetos se destaca, variando de 12 a 74% entre os diversos gêneros, representando a maior porção de sua composição (BESSA et al., 2017). Estudos demonstram, ainda, que os insetos contêm quantidade substancial de ácidos graxos insaturados, com foco específico no ácido linoleico (ômega - 6) e

no ácido  $\alpha$ -linolênico (ômega - 3) (CHAKRAVORTY et al., 2014; JANSSEN et al., 2017). Os insetos também contêm carboidratos estruturais na forma de exoesqueleto quitinoso equivalentes aos encontrados em fibras, em proporções semelhantes à celulose em alimentos à base de grãos (BUKKENS, 2005). Alguns trabalhos mostraram, ainda, que os minerais ferro e cálcio estão presentes em concentrações maiores do que as encontradas na carne bovina, e que alguns insetos são ricos em vitaminas do complexo B,  $\beta$ -caroteno e vitamina E (BUKKENS, 2005; RUMPOLD, SCHLÜTER, 2013; RAUBENHEIMER, ROTHMAN, 2013), podendo alguns nutrientes serem afetados por seu estágio de desenvolvimento (SPANGHERS et al., 2016; DANIELI et al., 2019).

Verifica-se, portanto, que o potencial do uso de insetos na alimentação, bem como sua utilização no desenvolvimento de produtos alimentícios, é um interesse global crescente. O presente estudo baseou-se na hipótese de que as farinhas de insetos são ricas nutricionalmente, possuem em sua composição elevado conteúdo de elementos químicos, vitaminas, atividade antioxidante, compostos fenólicos e proteínas com boa digestibilidade e solubilidade. Além disso, hipotetizou-se que o estágio de desenvolvimento do inseto influencia em seu conteúdo nutricional.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Caracterizar nutricionalmente farinhas de insetos comestíveis com potencial de uso na alimentação humana (*Gryllus assimilis*, *Tenebrio molitor* e *Belostoma anurum*).

### 2.2 Objetivos específicos

- Revisar sistematicamente a literatura quanto à qualidade proteica do uso de farinhas de insetos em estudos *in vivo*.
- Caracterizar a composição centesimal (umidade, proteínas, lipídios, cinzas e carboidratos) das farinhas de *Gryllus assimilis*, *Tenebrio molitor* e *Belostoma anurum*;
- Avaliar o conteúdo de minerais (fósforo, potássio, cálcio, magnésio, cobre, ferro, zinco, manganês, cromo e molibdênio) das farinhas de *Gryllus assimilis*, *Tenebrio molitor* e *Belostoma anurum*;
- Mensurar o potencial de contribuição segundo a recomendação diária de nutrientes das farinhas de *Gryllus assimilis*, *Tenebrio molitor* e *Belostoma anurum*;
- Caracterizar o perfil de aminoácidos das farinhas de *Gryllus assimilis*, *Tenebrio molitor* e *Belostoma anurum*;
- Determinar a ocorrência e concentração de carotenoides, vitamina E ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  tocoferóis e tocotrienóis), vitamina C (ácido ascórbico) e vitaminas do complexo B (riboflavina, piridoxina e niacina) nas farinhas de *Gryllus assimilis* e *Tenebrio molitor*;
- Avaliar a ocorrência e concentração de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante nas farinhas de *Gryllus assimilis* e *Tenebrio molitor*;
- Mensurar a digestibilidade proteica *in vitro* das farinhas de *Gryllus assimilis* e *Tenebrio molitor*;
- Determinar a solubilidade proteica em função do pH das farinhas de *Gryllus assimilis* e *Tenebrio molitor*.
- Avaliar influência do estágio de desenvolvimento na composição das farinhas de *Gryllus assimilis* e *Tenebrio molitor*.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Entomofagia: histórico e importância

O início da prática de comer insetos, denominada entomofagia, data do período Pleistoceno (entre 2,588 milhões e 11,7 mil anos) (SUTTON, 1990). A utilização dos insetos como fonte de alimento se iniciou com os primeiros homínídeos e, está presente em mais de 100 países no mundo (RAMOS-ELORDUY, 1998; RAMASWARY, 2014).

É possível rastrear o surgimento da entomofagia de acordo com três estágios principais: tempos antigos, Idade Média e entomofagia moderna. A entomofagia moderna refere-se à redescoberta da prática pela cultura ocidental, que foi trazida de volta ao século XIX por exploradores e suas observações de condados tropicais na África do Norte e Central ou práticas alimentares indígenas na América do Norte e do Sul (LOCKWOOD, 2004). Cerca de 91 espécies de insetos eram utilizadas como alimentação pelo povo asteca e preparadas de diferentes maneiras: assadas, fritas, branqueadas ou como temperos ou, até mesmo, *in natura* (RAMOS-ELORDUY, 1996).

Os insetos podem ser consumidos de diversas maneiras e em diferentes estágios evolutivos e, além de seu consumo direto, também apresentam grande importância comercial devido aos produtos por eles produzidos e/ou excretados, como, por exemplo, o mel e a seda (FAO 2013). As abelhas produzem cerca de 1,2 milhão de toneladas de mel comercial por ano (FAO, 2009), enquanto os bichos-da-seda produzem mais de 90.000 toneladas de seda (YONG-WOO, 1999). Dentre esses produtos, também está o carmim, um corante vermelho produzido por cochonilhas (ordem Hemiptera), que é usado para colorir alimentos, tecidos e produtos farmacêuticos.

Atualmente, são identificadas mais de 2100 espécies de insetos comestíveis ao redor do mundo (MITSUHAHI, 2016). Essas espécies são coletadas na natureza, em estado selvagem, semi cultivadas ou cultivadas em países do sudeste asiático, Tailândia e China (HANBOONSONG et al., 2013).

A entomofagia é mais comum na África, Colômbia, México, China, Tailândia, Indonésia, Japão e Austrália (DEFOLIART, 2002). Entretanto, nos países em que os padrões dietéticos são ocidentalizados, o consumo humano de insetos é raro ou mesmo culturalmente inapropriado, resultando em rara discussão como pauta das agendas de sustentabilidade e segurança alimentar (VAN HUIS, 2013).

Desde 2003, a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) tem trabalhado em tópicos relacionados à entomofagia em muitos países do mundo, com

foco na geração e compartilhamento de conhecimento sobre o tema e prestação de apoio aos países membros (FAO, 2013).

Visando discutir questões relacionadas à utilização de insetos como alimentos e rações, foi realizada, em 2014, a Conferência Mundial sobre Insetos para Alimentar o Mundo. Na conferência, representantes de 42 países concluíram que os principais desafios incluem: maior conscientização do público em geral para promover os insetos como alimento saudável para humanos e animais; influenciar os formuladores de políticas a aprovar legislações de alimentos e rações que incluem insetos; e mais esforços de pesquisa para fornecer e expandir, com dados validados, evidências científicas e os benefícios do uso de insetos nas cadeias de alimentos (FAO / WUR 2014).

Atualmente, os insetos mais comumente consumidos são besouros (Coleoptera), lagartas (Lepidoptera) e abelhas, vespas e formigas (Hymenoptera), representando, respectivamente, 31%, 18% e 14% dos insetos utilizados na alimentação humana (FAO, 2013). Em seguida, estão gafanhotos, grilos (Orthoptera), cigarras, cochonilhas e percevejos (Hemiptera), cupins (Isoptera), libélulas (Odonata), moscas (dípteros) e outras ordens (5 %) (FAO, 2013).

No Brasil, apesar de a entomofagia estar associada a hábitos de comunidades marginalizadas (COSTA NETO, 2003), quatro insetos principais integram a dieta de algumas comunidades: içá ou tanajura (*Atta spp.*); a larva do bicho-da-taquara (*Morpheis smerintha*, Lepidoptera); as larvas de bicho-das-palmeiras (*Rhynchophorus palmarum* e *Rhino barbirostris*) e a larva do bicho-do-coco (*Pachymerus nucleorum*, Coleoptera) (CARRERA 1992). Embora ainda pouco consumidos no país, o grilo (*Gryllus assimils*), a larva-da-farinha (*Tenebrio molitor*) e insetos do gênero *Belostoma* vem sendo estudados como uma iniciativa para promover a difusão de alimentos alternativos (SINGSON et al., 2016; FENG, 2018; ARAÚJO, et al., 2019). Aliado a isso, as limitadas opções para aquisição de insetos comestíveis presentes no mercado brasileiro contribuíram com a escolha desses insetos (*Gryllus assimils*, *Tenebrio molitor* e *Belostoma anurum*) para o desenvolvimento do presente estudo.

### **3.2 Aspectos nutricionais**

Considerando as diferentes ordens, os principais componentes nutricionais dos insetos são proteínas e lipídios, seguidos por fibras e cinzas (RUMPOLD, SCHLÜTER, 2013). Há, no entanto, grande variação na composição dos insetos comestíveis. As espécies da ordem Coleoptera (besouros, larvas), por exemplo, apresentam conteúdo proteico que varia de 8,85 a 71,10% (RUMPOLD, SCHLÜTER, 2013). Essa variação não se origina apenas das diferenças

entre as espécies e estágios de desenvolvimento, mas também de diferentes alimentos e origens (CHEN et al., 2009; RAMOS-ELORDY et al., 2002). O principal interesse no uso de insetos na alimentação humana tem foco no seu alto conteúdo de proteína. Por exemplo, 100 g de lagartas (larvas de mariposa ou borboleta) fornecem 76% da quantidade diária de proteínas necessária e quase 100% da quantidade diária recomendada de vitaminas para humanos (RUMPOLD, SCHUTER 2013).

Além de um conteúdo proteico elevado, para que um alimento seja considerado boa fonte desse nutriente, a qualidade de sua proteína também deve ser considerada. Essa qualidade está intimamente relacionada com sua composição de aminoácidos. Nesse quesito, as proteínas de inseto se destacam por fornecerem satisfatoriamente todos os aminoácidos necessários em uma dieta saudável (VAN HUIS, 2016; GRAVEL, DOYEN, 2018). Huang et al. (2019) verificaram níveis de aminoácidos indispensáveis presentes na mosca soldado negro (*Hermetia illucens*L.) acima dos níveis sugeridos pelo padrão FAO/OMS. Resultado semelhante foi encontrado por Yi et al. (2013) em cinco espécies de insetos comestíveis. Além disso, os autores verificaram que os níveis de aminoácidos essenciais em todas as espécies foram comparáveis aos das proteínas da soja.

Ainda, quando se refere à qualidade de uma proteína, é necessário levar em consideração o quanto dessa proteína é, de fato, digerida após sua ingestão. A digestibilidade da proteína de insetos é altamente variável, visto que uma parte de seus aminoácidos estão ligados à quitina, um polissacarídeo presente no exoesqueleto de insetos (VAN HUIS, 2016).

São escassos na literatura dados sobre a concentração de vitaminas dos insetos comestíveis até o momento. No entanto, Rumpold e Schuter (2013) observaram que 100 g de insetos (base seca) de diferentes ordens são geralmente ricos em riboflavina, ácido pantotênico e biotina. Pennino et al. (2007) investigaram a ocorrência e concentração de retinol e  $\alpha$ -tocoferol em invertebrados utilizados na alimentação humana e concluíram que, de maneira geral, os insetos são pobre fonte de vitamina A. Os insetos aquáticos, entretanto, continham níveis mais elevados de vitamina E. Porém, vale ressaltar que é a concentração de vitamina E em invertebrados é modificável por meio dos níveis dietéticos desse nutriente na alimentação fornecida aos insetos (PENNINO et al., 2007).

Em resumo, embora os insetos comestíveis possam ser considerados boas fontes de algumas vitaminas, a adequada seleção da espécie e a escolha do melhor regime de alimentação devem ser levados em consideração para que se forneçam concentrações adequadas desses nutrientes.

### **3.3 Entomofagia e segurança alimentar e nutricional**

A Segurança Alimentar e Nutricional (SAN) é definida pela Lei nº 11.346, de 15 de julho de 2006 como a realização do direito de todos ao acesso regular e permanente a alimentos de qualidade, em quantidade suficiente, sem comprometer o acesso a outras necessidades básicas, que respeitem a diversidade cultural e que sejam social, econômica e ambientalmente sustentáveis.

De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), até 2050 a população mundial chegará a 9,6 bilhões de pessoas. Há uma necessidade urgente de reavaliação da maneira como se come e se produz para que sejam encontradas novas formas sustentáveis de cultivo de alimentos, especialmente em países desenvolvidos e industrializados, onde a porcentagem do consumo de proteína derivada da carne é maior do que nos países em desenvolvimento (BATAT, PETER, 2020).

Diante desse cenário, a insegurança alimentar e nutricional torna-se cada vez mais um desafio e um problema crescente. Nesse sentido, os insetos comestíveis podem fornecer uma valiosa fonte alimentar, uma alternativa sustentável para lidar com as questões da fome, da superexploração dos recursos naturais e da superprodução e consumo de proteínas animais, além da criação de empregos, uma vez que os insetos são considerados uma biotecnologia emergente (BATAT, PETER, 2020).

Em todo o mundo, a entomofagia desempenha papel importante na segurança alimentar humana. Atualmente, os insetos comestíveis são um recurso alimentar natural para muitos grupos étnicos na Ásia, África, México e América do Sul, onde a entomofagia pode ser sustentável e tem benefícios econômicos, nutricionais e ecológicos para as comunidades rurais (YEN, 2010).

Entretanto, embora a entomofagia seja considerada uma das soluções práticas e viáveis para contribuir para a segurança alimentar, ainda são escassos na literatura estudos que avaliam de forma completa a composição nutricional e a viabilidade alimentar, econômica, e de produção desses insetos destinados ao consumo humano.

### **3.5 Entomofagia e sustentabilidade**

Tradicionalmente em países tropicais, os insetos comestíveis são colhidos da natureza; entretanto o potencial de criação desses animais em instalações industriais confinadas está sendo investigado, motivado pela necessidade de se encontrar fontes alternativas de proteína (VAN HUIS et al., 2017). A busca por fontes alternativas de proteína se dá, principalmente, pelo aumento da demanda global por carne e pela redução da disponibilidade de terras para a

pecuária. Nos últimos 50 anos, o crescimento da população humana, o aumento da renda e urbanização proporcionaram aumento do consumo de alimentos de origem animal (HERRERO et al., 2015). O setor pecuário, então, cresce em uma taxa acelerada e compete cada vez mais por recursos e causa pressões ambientais generalizadas em muitas partes do mundo (REHMAN et al., 2021).

Atualmente, a carne representa cerca de 15% da energia total na dieta humana, enquanto aproximadamente 80% das terras agrícolas são usadas para pastagem animal ou produção de ração para rebanhos (HERRERO et al., 2015; HERRERO et al., 2016). Além disso, o setor impacta negativamente em questões ambientais, contribuindo para a acidificação devido à lixiviação de amônia, mudança climática devido às emissões de gases de efeito estufa, desmatamento, erosão do solo, desertificação, perda de biodiversidade vegetal e poluição da água (STEINFELD et al., 2006; GERBER et al. 2013).

Visando adotar uma alimentação ambientalmente mais sustentável, a redução do consumo de carne vermelha pode ser estabelecida por sua substituição por proteínas vegetais ou por uma transição de ruminantes para espécies de menor impacto (por exemplo, porcos e aves) (SMIL, 2002). Ainda assim, possibilidades de outras fontes alternativas de proteína são investigadas, tais como carne cultivada *in vitro*, algas marinhas, microalgas e insetos (ONWEZEN et al., 2020). Smetana et al. (2015) compararam o impacto ambiental de vários substitutos de carne, com base em vários indicadores. Os autores concluíram que os produtos à base de insetos e farelo de soja foram associados ao menor impacto ambiental.

Os insetos produzem quantidades muito menores dos gases metano e óxido nitroso do que o gado convencional, gases esses responsáveis pelo efeito estufa (OONINCX et al., 2010). Além disso, podem ser criados e multiplicados facilmente em pequenos espaços e por um curto período, devido ao seu curto ciclo de vida e alta taxa de crescimento intrínseco.

### **3.6 *Gryllus assimilis***

O *Gryllus assimilis* (FABRICIUS, 1775) é comumente conhecido como grilo preto, grilo do campo ou grilo jamaicano (Figura 1). Trata-se um grilo monomórfico totalmente alado, conta com 3 pares de asas longas e é amplamente distribuído na Índias Ocidental e nos países da América do Sul e Central (ZERA et al., 1998). Na natureza, os grilos representam pragas eventuais, responsáveis por danos econômicos em áreas agrícolas (BARBOSA et al., 2009).



Fonte: BugGuide 2018.

Figura 1. *Gryllus assimilis*

O gênero *Gryllus* é composto por grupo com cerca de 2 mil espécies descritas e dentre as mais frequentes no Brasil está o *Gryllus assimilis*. Esses insetos possuem o hábito de ingerir uma ampla variedade de fontes alimentares e, devido a isso, são considerados polívoros, preferencialmente atacando hortaliças, viveiros e, esporadicamente, culturas extensivas como algodão, soja, milho, girassol e pastagens (GASSEN, 1996). De maneira geral os grilos possuem hábitos noturnos, vivem em ambientes com vegetação rasteira, campos nativos ou em lavouras com cobertura vegetal deficiente (BARBOSA et al., 2009). Durante o dia, permanecem em ambientes úmidos e escuros sob detritos e galerias subterrâneas (GASSEN, 2002).

Em busca de inserir esse inseto na alimentação humana, pesquisas investigaram diferentes formas de consumo do grilo (*Gryllus assimilis*) como, por exemplo, em forma de suplementos ou aditivos ricos em proteínas e como uma nova fonte alternativa de proteína para pães sem glúten (MACHADO et al., 2019; MONTOWSKA et al., 2019). O perfil nutricional de *Gryllus assimilis* também desperta interesse. Seu conteúdo proteico corresponde à maior porcentagem em termos de macronutrientes, girando em torno de 61,0 a 65,52% de sua composição (ARAÚJO et al., 2019; BISCONSIN-JUNIOR et al., 2018), seguido pela concentração de lipídios (20,96%) fibras dietéticas (8,42%) e cinzas (3,19%) (MACHADO, et al., 2019).

Dentre os minerais encontrados em sua composição, destaca-se o cálcio, representando o mineral mais expressivo, com valores muito superiores aos encontrados nas demais fontes de proteína animal (ARAÚJO et al., 2019). Ainda são limitados dados na literatura sobre o conteúdo de vitaminas no *Gryllus assimilis*, entretanto, Schmidt et al. (2019) encontraram em sua composição 2,88  $\mu\text{g}$  de vitamina B<sub>12</sub> / 100 g, confirmando ser uma excelente fonte de vitamina B<sub>12</sub>, podendo contribuir significativamente para as necessidades nutricionais desse nutriente.

Além de seu interessante perfil nutricional, a incorporação de grilos na alimentação é facilitada pelo seu sabor descrito como semelhante a frutas secas e amêndoas, enquanto a textura foi descrita como crocante (SOGARI, 2015).

### 3.7 *Tenebrio molitor*

O *Tenebrio molitor* L. é a larva de um dos maiores besouros conhecidos que infesta produtos alimentícios armazenados (SIEMIANOWSKA et al., 2013). Larvas amareladas compostas de um exoesqueleto duro e quitinoso eclodem de seus ovos e em sua fase adulta, são utilizadas como alimento humano em algumas partes do mundo (Figura 2) (GHALY, ALKOAİK, 2009)



Fonte: Souza et al., (2018).

**Figura 2.** Ciclo de vida do *Tenebrio molitor* em seus estágios: (A) larva, (B) pupa e (C) adulto

Em países como a Holanda ou China, as larvas da farinha são utilizadas como ingredientes alimentares e, cada vez mais, são vistas como fonte de proteína alternativa à carne (JEON, et al., 2016). Estudos recentes avaliam ainda a fortificação de farinhas tradicionais por meio da adição de farinha de *Tenebrio molitor* L. na produção de pães e massas (RONCOLINI et al., 2019; ÇABUK, BURAK, 2020).

As larvas de *Tenebrio molitor* L. *in natura* e em pó foram caracterizadas quanto ao conteúdo de minerais, e possuem maiores concentrações de fósforo, magnésio, zinco, ferro, cobre e manganês quando comparadas a carnes convencionais e ovos (SIEMIANOWSKA et al., 2013). Adequada proporção de ácidos graxos ômega-6 / ômega-3 é encontrada nas larvas, fato que pode ser considerado como outro determinante de sua qualidade nutricional (SIEMIANOWSKA et al., 2013).

### 3.8 *Belostoma anurum*

Os insetos aquáticos gigantes (Heteroptera: Belostomatidae) são predadores de habitats de água doce e incluem 150 espécies distribuídas em todas as áreas tropicais e subtropicais do mundo (OHBA, 2019). Dentre elas, a espécie *Belostoma anurum* (HERRICH-

SCHÄFFER) (Figura 3) ocorre da Venezuela à Argentina (RIBEIRO, 2007). Ninfas e adultos de *B. anurum* são predadores vorazes, normalmente encontrados à beira da água com as patas dianteiras posicionadas esperando por suas presas (OUYANG et al., 2017; OHBA 2019).



Fonte: De Reyes, Estévez, (2005).

**Figura 3.** *Belostoma anurum*

Caracterizada pela digestão extraoral, a *Belostoma anurum* captura presas utilizando suas patas dianteiras, injetam toxinas que causam paralisia da presa e secretam enzimas que dissolvem os tecidos do corpo, permitindo-lhes sugar a presa liquefeita (OUYANG et al 2017). Essa espécie se alimenta de uma variedade de animais aquáticos, como insetos, cladóceros, anfípodes, girinos e pequenos peixes (OUYANG et al., 2017; OHBA 2019).

Em um estudo realizado em mercados da Índia, verificou-se que insetos do gênero *Belostoma* são coletados para comercialização junto com os peixes durante a pesca (SINGSON et al., 2016). Os insetos aquáticos gigantes são assados no fogo ou fritos em óleo e servidos inteiros ou, de preferência, fazendo uma pasta com pimenta e outros temperos (SINGSON et al., 2016). Esses insetos não são encontrados em grandes números, no entanto, alguns deles são suficientes para uma refeição, pois são fortemente aromáticos, sendo utilizados como aditivos de sabor em preparações por apresentarem sabor marcante (ALEMLA, SINGH, 2004). Singson et al. (2019) relatam ainda que insetos do gênero *Belostoma* são utilizados mais como um aperitivo do que como uma fonte de nutrientes.

São escassas na literatura informações nutricionais referentes à espécie *Belostoma anurum*. Baseado em sua matéria seca, espécies do gênero *Belostoma*. possuem 70,87% de proteína em sua composição (Phillips et al., 1995). Um estudo que avaliou insetos gigantes

aquáticos provenientes da Tailândia encontrou, em base úmida, conteúdos elevados de cálcio (43,5 mg/100 g), proteína (19,8 g/100 g) e lipídios (8,3 g/100 g) (POSHADRIA et al., 2018).

## **4 METODOLOGIA GERAL**

### **4.1 Insetos utilizados**

Os grilos (*Gryllus assimilis*) e larva-da-farinha (*Tenebrio molitor*) utilizados foram adquiridos em 2021, da empresa *Ecological Food*, localizada na cidade de Limeira, São Paulo. Para analisar a influência da idade dos insetos em sua composição, dois estágios de desenvolvimento de cada um dos insetos foram utilizados. Assim, para *Gryllus assimilis*, foram utilizados ninfa (GN) e adultos (GA) e, para *Tenebrio molitor*, larva (TL) e pupa (TP). Esses insetos foram alimentados com ração padrão, composta por farelo de trigo, ração de codorna e cenoura.

As baratas d'água (*Belostoma anurum*) foram obtidas a partir de criação já estabelecida no Laboratório de Fisiologia e Neurobiologia de Invertebrados da Universidade Federal de Viçosa (UFV), sob condições controladas ( $27 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $60 \pm 20\%$  UR, fotofase de 12 horas) (VALBON et al., 2018; CRUZ et al. 2021). Os adultos foram mantidos em aquário (30 x 40 x 60 cm) para que a cópula ocorresse livremente e, após, as fêmeas depositaram os ovos no hemiélitro de machos adultos. Os machos com ovos no hemiélitro foram individualizados em potes de plásticos perfurados (10,9 x 9,2 x 7,5 cm) colocados em bandejas com água e aquecedor. Estes adultos foram alimentados com percevejos aquáticos do gênero *Buenoa spp.* (Hemiptera: Notonectidae) até a emergência das ninfas. Após a emergência, as ninfas foram individualizadas em frascos de vidro (30 mL) até o terceiro ínstar, para evitar o canibalismo. As ninfas, ao atingirem o terceiro ínstar, foram transferidas para recipientes de plástico maiores (100 mL). Ninfas do primeiro e do segundo ínstar foram alimentadas diariamente com larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). A partir de ninfas de terceiro instar foram alimentados com peixes do tipo guppy coletados no setor de piscicultura da UFV.

### **4.2 Obtenção das farinhas de insetos**

O abate e processamento dos insetos foi conduzido conforme protocolo normalmente realizado pela indústria de alimentos (PATARATA, FRAQUEZA, 2017). Antes do abate, os insetos foram submetidos a jejum de cerca de 24 horas para redução do conteúdo intestinal, uma vez que não é possível retirá-los manualmente. Em seguida, os insetos foram abatidos por redução de temperatura em freezer a  $-20^\circ\text{C}$  por 24 horas. Posteriormente, os insetos passaram pelo processo de branqueamento para reduzir a contagem microbiana e inativar enzimas degradativas responsáveis pela deterioração dos alimentos (MELGAR-LALANNE et al.,

2019). Nesse processo, os insetos foram submergidos em água fervente por 3 minutos e, em seguida, foram submetidos a choque térmico em água resfriada por um minuto e drenados com o auxílio de peneira (VANDEWEYER et al., 2017). Na sequência, foram desidratados em estufa com circulação de ar a 45°C por 24 horas e, em seguida, foram triturados em moinho analítico até a obtenção de uma farinha de fina granulação. As farinhas foram armazenadas em freezer (-18°C) até o momento das análises.

### **4.3 Determinação da composição centesimal**

As análises de composição centesimal nas amostras seguiram metodologia da *Association of Official Analytical Chemists* (2012).

#### **4.3.1 Determinação da umidade**

Para determinar a composição centesimal em base seca, as amostras de farinhas de insetos foram analisadas quanto ao teor de umidade segundo técnica gravimétrica, com emprego de calor em estufa com circulação forçada de ar, a 105 °C, até peso constante. Assim, 5 g das farinhas de insetos foram colocadas em placas de Petri previamente secas. As placas contendo as amostras foram submetidas ao calor da estufa (105 °C por 24 h), até a obtenção de peso constante, obtido utilizando balança semi-analítica (Gehaka, AG200).

O conteúdo de umidade foi determinado segundo a fórmula:

$$\% \text{ de umidade (m/m)} = (P_u - P_s / P_u) \times 100$$

Onde  $P_u$  = Peso da amostra úmida (peso inicial) e

$P_s$  = Peso da amostra seca (peso final)

#### **4.3.2 Determinação de lipídios**

O conteúdo de lipídios totais foi determinado usando a extração *Soxhlet* de acordo com o método 920.39 (AOAC, 2011). Cartuchos em papel manteiga, tamanho de 12 x 25 cm e fundo revestido com algodão isento de lipídios foram secos em estufa a  $75 \pm 1$  °C, por uma noite e, em seguida, resfriados em dessecador até atingir a temperatura ambiente. Para análise, em torno de 5-10 g das amostras foram pesadas separadamente, adicionadas nos cartuchos preparados e pesados novamente. Os cartuchos foram adaptados ao aparelho extrator e, logo após, adicionados aproximadamente 120 mL do solvente éter etílico em cada balão. A extração dos lipídios foi realizada por período de 6 horas em temperatura de  $95 \pm 1$  °C. Após a destilação, os balões foram secos em estufa a  $105 \pm 1$  °C até a obtenção de massa constante.

O percentual de lipídios nas amostras foi determinado segundo a fórmula:

$$\% \text{ de lipídios(m/m)} = 100 \times N/P$$

Onde: N = nº de gramas de lipídios

P = nº de gramas da amostra

#### 4.3.3 Determinação de cinzas totais

O conteúdo de cinzas foi obtido pela incineração das amostras em um forno mufla a 550 °C por 24 h de acordo com o método 942.05 (AOAC, 2012). Cadinhos de porcelana foram secos em mufla a 600 °C, resfriados em dessecador e pesados em balança analítica. Em seguida, foram adicionados, aproximadamente, 2 g de amostra seca e levados de volta a mufla, para que fosse realizada a carbonização lenta das amostras para a exalação dos vapores, aumentando a temperatura em 50°C a cada intervalo de 5 minutos até atingir 350°C, permanecendo nesta durante 60 minutos. Posteriormente a temperatura foi elevada a 600°C, durante 6 horas até a obtenção de cinzas claras ou levemente acinzentadas. As cinzas foram então resfriadas, por 30 minutos, em dessecador contendo sílica gel até atingir temperatura ambiente, para posterior pesagem em balança semi analítica (Gehaka, AG200) e cálculo.

O conteúdo de cinzas foi determinado segundo a fórmula:

$$\% \text{ resíduo (cínzas) (m/m)} = 100 \times P / A$$

Onde: P = peso em g de resíduo

A = volume em mL da amostra

#### 4.3.4 Determinação de proteínas

A determinação de proteínas foi realizada utilizando os equipamentos de digestão, destilação e titulação de Kjeldahl. Em papel-manteiga, foram pesados 200 mg das amostras previamente secas, o material foi transferido para tubo de digestão e adicionado de 1 g de mistura catalisadora constituída de 94% de sulfato de potássio, 5% de sulfato de cobre, 1% de selênio. Posteriormente, na capela de exaustão, foram adicionados 3 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Depois de vedados, os tubos foram levados ao bloco digestor. Logo após, a temperatura foi elevada até atingir 380°C durante 90 minutos; depois desse tempo, o bloco foi desligado, sendo as amostras resfriadas em temperatura ambiente.

Os sistemas de digestão e exaustão foram acionados aumentando a temperatura, a cada 10 minutos, de 50°C em 50°C até atingir 350°C durante 60 minutos. Depois, a temperatura foi elevada a 380°C durante 90 minutos e, após este procedimento, o bloco digestor foi desligado até atingir a temperatura ambiente. Após a digestão, os tubos foram levados ao destilador de nitrogênio (Marconi, MA 036) e acrescidos de, aproximadamente, 10 mL de NaOH 50% até a mistura apresentar coloração escura.

Em erlenmeyer de 250 mL, foram adicionados 10 mL de solução de ácido bórico (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) e solução indicadora composta de 1% de verde de bromocrezol e 1% de vermelho de

metila em etanol, sendo as amostras submetidas ao condensador do aparelho. A destilação foi efetuada até a obtenção de 75 mL de solução de coloração roxa. A solução obtida durante a destilação foi titulada com solução HCl 0,05 mol/L até o ponto de viragem do indicador de fenolftaleína.

#### **4.3.5 Cálculo de carboidratos**

Os carboidratos foram estimados por diferença, por meio da fórmula:

$\% \text{ carboidratos} = 100 - \% \text{ de umidade} - \% \text{ de fração lipídica} - \% \text{ de fração proteica} - \% \text{ de cinzas.}$

#### **4.3.6 Cálculo da densidade calórica**

O cálculo da densidade calórica total foi estimado considerando os fatores de conversão de 4 kcal/g para proteínas e carboidratos e 9 kcal/g para lipídios (BUCHHOLZ e SCHOELLER, 2004).

#### **4.4 Determinação da ocorrência e concentração de minerais**

Foram determinadas as concentrações de P, K, Ca, Mg, Zn, Mn, Fe, Cu, Na, Cr, e Mo nas amostras de farinha de insetos. As análises foram realizadas nos Laboratórios de Análise de Solos e de Absorção Atômica do Departamento de Solos - UFV.

Para a digestão e análise das amostras, as vidrarias foram higienizadas, mergulhadas em solução de HCl a 2% por período de trinta minutos e enxaguadas em água deionizada. Após a lavagem, foi drenado o excesso de água e as vidrarias foram levadas à estufa com circulação forçada de ar, a  $50 \pm 1^\circ\text{C}$ , até a secagem completa das mesmas. Após a secagem, foi realizada a digestão das amostras e leitura da concentração de minerais, de acordo com a metodologia proposta por Gomes & Oliveira (2011), adotando o seguinte procedimento: foram pesados 0,5 g da amostra, colocados em tubos de digestão e adicionados 10 mL da mistura de ácido nítrico + ácido perclórico na proporção 4:1, utilizando capela de exaustão. Em seguida, os tubos foram levados à chapa pré-aquecida a  $80^\circ\text{C}$ , e elevada a temperatura gradativamente até atingir  $200^\circ\text{C}$ . Assim que o extrato atingiu a coloração cristalina, foi retirado da chapa, resfriado em temperatura ambiente e o volume completado para 25 mL com água deionizada. A solução obtida nesse processo foi utilizada na leitura da concentração dos minerais por espectrometria de emissão atômica em plasma indutivamente acoplado (ICP-AES) (Perkin Elmer, Optima 8300), com fonte de plasma de argônio induzido, e com as seguintes condições: potência de 1300W, fluxo de ar refrigerante de 15 L/minuto, fluxo de ar auxiliar de 0,7 L/minuto, fluxo de ar carregador de 0,5 L/minuto, velocidade de introdução de amostra de 1,5 mL/minuto e uso de nebulizador Perkin Elmer.

## 4.5 Investigação da ocorrência e concentração de vitaminas

As análises de vitaminas foram realizadas no Laboratório de Análise de Vitaminas (LAV) do Departamento de Nutrição e Saúde - UFV. Durante todo o processo, as amostras foram mantidas sob proteção da luz solar e artificial, pela utilização de vidrarias âmbar, papel alumínio e cortinas do tipo blackout, e sob proteção do oxigênio através do uso de vidrarias com tampas.

### 4.5.1 Vitamina C

As condições de extração e análise de vitamina C (na forma de ácido ascórbico - AA) foram realizadas de acordo com a metodologia proposta por Campos et al. (2009). Para extração, foram pesados de 1g de amostra, previamente homogeneizada em processador de alimentos. A amostra foi triturada por 5 minutos em 15 mL de solução extratora contendo ácido metafosfórico 3%, ácido acético 8%, ácido sulfúrico 0,3 N e EDTA 1mM e filtrada a vácuo em funil de büchner. O volume foi completado para 25 mL em balão volumétrico, com água ultrapura e centrifugada a velocidade de 4000 rpm (1789 g) durante 15 minutos antes de ser acondicionada em geladeira (em torno de 10 °C) até o momento das análises.

As análises de AA nas farinhas foram feitas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Antes da injeção, o material foi novamente filtrado utilizando-se unidades filtrantes com 0,45 µm, sendo injetados 50 µL de amostra.

As condições de análise de AA foram: coluna cromatográfica RP-18; detector de arranjos de diodos, fase móvel – água ultrapura contendo 1mM de fosfato monobásico de sódio, 1mM de EDTA e pH ajustado em 3,0 com ácido fosfórico; fluxo da fase móvel: 1,0 mL/minuto; tempo de corrida: 8 minutos. Os cromatogramas foram lidos em comprimento de onda de 245 nm (CAMPOS et al., 2009).

### 4.5.2 Vitamina E

Foi investigada a ocorrência e concentração de  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ - (alfa, beta, gama e delta) tocoferóis e tocotrienóis nas farinhas (PINHEIRO-SANT'ANA et al., 2011). Para extração, foram pesados cerca de 10 g de amostra previamente homogeneizada em processador de alimentos. Em seguida, foram adicionados 4 mL de água deionizada aquecida (aproximadamente 80°C), 5 g de sulfato de sódio anidro, 10 mL de isopropanol e 1 mL de hexano contendo 0,05% de BHT e 25 mL de solução solvente (hexano:acetato de etila, 85:15, v/v), sendo essa mistura triturada e filtrada a vácuo.

Após a extração e filtração, o resíduo retido no filtro foi lavado com 15 mL de solução solvente e este transferido ao tubo de trituração onde a etapa de extração foi repetida

adicionando-se 5 mL de isopropanol e 30 mL de mistura solvente, com posterior homogeneização e filtração a vácuo. O resíduo foi novamente lavado com 5 mL de mistura solvente, evaporado em rotavapor, utilizando temperatura de 70°C e transferido para balão volumétrico, sendo o volume completado com solução solvente para 25 mL.

Após a completa homogeneização do extrato, uma alíquota de 5 mL foi evaporada em gás nitrogênio e armazenada em vidros âmbar hermeticamente vedados em temperatura de -5°C, até o momento da análise cromatográfica. As análises dos tocoferóis e tocotrienóis foram conduzidas por CLAE, utilizando-se as seguintes condições cromatográficas: detector de fluorescência (290 nm de excitação e 330 nm de emissão); coluna LiChrosorb (Si60 Phenomenex 250 x 4 mm, 5 µm) munida de coluna de guarda (Phenomenex sílica, 4 mm x 3 mm); fase móvel – hexano: isopropanol: ácido acético glacial (98,9:0,6:0,5, v/v/v); fluxo da fase móvel: 1,0 mL/min. Após extração, as alíquotas das amostras secas em nitrogênio foram redissolvidas em 2 mL de hexano e filtradas por meio de unidades filtrantes com porosidade de 0,45 µm. As análises foram realizadas injetando-se de 5 µL a 50 µL para detecção dos diferentes compostos da vitamina E nas farinhas (PINHEIRO-SANT'ANA et al, 2011).

#### **4.5.3 Carotenoides**

O processo de extração dos carotenoides foi realizado de acordo com Rodriguez-Amaya et al. (1976). Cerca de 3g de amostra foram triturados em 60 mL de acetona refrigerada (dividida em três volumes de 20 mL) por aproximadamente 5 minutos. O material foi filtrado a vácuo em funil de büchner utilizando-se papel de filtro. Em seguida, o filtrado foi transferido, aos poucos, para o funil de separação, onde foram adicionados 50 mL de éter de petróleo refrigerado, visando à transferência dos pigmentos da acetona ao éter. Cada fração foi lavada com água destilada três vezes, retirando toda a acetona. Foi acrescentado sulfato de sódio anidro ao extrato em éter de petróleo retirando o resíduo de água restante, evitando prejudicar a evaporação do material. A concentração do material foi feita por evaporação do extrato em éter de petróleo usando evaporador rotativo em temperatura de 35°C. Os pigmentos foram, então, redissolvidos em quantidade conhecida de éter de petróleo (25 mL) e armazenados em frascos de vidro âmbar em congelador (em torno de -5°C), até o momento da análise.

As análises foram realizadas por CLAE. Para análise, uma alíquota (2 mL) do extrato armazenado em éter de petróleo foi evaporada sob fluxo de nitrogênio e, em seguida, recuperada na mesma quantidade de metanol e filtrada em unidade filtrante de 0,45 µm. Foram injetados 50 µL de extrato. As análises de carotenoides seguiram as condições cromatográficas desenvolvidas por Pinheiro-Sant'Ana et al. (1998), sendo: coluna cromatográfica RP-18;

detector de arranjos de diodos; fase móvel – metanol:acetato de etila: acetonitrila (80:10:10); fluxo da fase móvel: 2,0 mL/minuto; tempo de corrida: aproximadamente 12 a 15 minutos. Os cromatogramas foram lidos em comprimento de onda de 450 nm.

#### **4.5.4 Riboflavina**

A extração e análise de riboflavina foi conduzida de acordo com Pinheiro-Sant'Ana (1999), com modificações. Cinco gramas de cada farinha foram pesados e adicionados de 50 mL de ácido clorídrico 0,1 N. As amostras foram trituradas em microtriturador e hidrolisadas em autoclave a 121°C por 30 min. A mistura foi resfriada e o pH foi ajustado em pHmetro com auxílio de agitador magnético para 4,0-4,5 com cerca de 3 mL de acetato de sódio 2M. 5 mL de Clara-diafase 6% foram adicionados e a mistura foi incubada em banho-maria por 3 h a 50°C, em seguida seu volume foi completado para 100 mL com água destilada. As amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm (2.800 g) por 25 min e, em seguida, filtradas em filtro de papel. A detecção de riboflavina foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando as seguintes condições cromatográficas: coluna cromatográfica RP-18 (250 x 4 mm); detector de fluorescência; fase móvel composta por 34% de metanol + 65% de água + 1% de ácido acético (contendo 0,005 M de ácido heptanosulfônico); tempo de corrida: aproximadamente 10 minutos.

#### **4.5.5 Niacina (B<sub>3</sub>)**

A extração e análise de niacina foi realizada conforme proposto por Pinheiro-Sant'Ana (1999) com modificações. Uma amostra de 5g das farinhas de inseto foi pesada e adicionada de cerca de 75 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. As amostras foram homogeneizadas em microtriturador e autoclavadas a 121°C por 60 min. A mistura foi resfriada em banho de gelo e o volume completado para 100 mL com água destilada. As amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm por 25 min, filtradas e injetadas para análise. A detecção de ácido nicotínico foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando as seguintes condições cromatográficas: coluna cromatográfica RP-18; detector de fluorescência; fase móvel – acetonitrila:água (5:95); fluxo da fase móvel: 0,8 mL/minuto; tempo de corrida: aproximadamente 20 minutos. Os cromatogramas foram lidos em comprimento de onda de 261 nm.

### **4.6 Potencial de contribuição segundo a recomendação diária de nutrientes**

O potencial de contribuição das farinhas de insetos para o atingimento das recomendações diárias de proteínas, carboidratos, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, cobre, ferro, zinco, manganês, sódio, cromo, vitamina C, vitamina E e niacina foi estimado com base

nas *Recommended Dietary Allowance* (RDA), para mulheres e homens adultos com idade entre 19 e 30 anos (IOM, 2001; IOM, 2005; IOM, 2011).

#### **4.7. Determinação dos compostos fenólicos totais**

##### **4.7.1 Obtenção dos extratos**

Para preparo dos extratos, foram utilizados 2 g das amostras em base úmida. Foram adicionados às amostras 20 mL de solução de extração composta de acetona: água (70:30, v/v), sendo a mistura submetida à agitação em banho metabólico (DUBNOFF modelo MA-093) (180 rpm), em temperatura ambiente por 2 horas. As amostras foram centrifugadas (Multi-purpose centrifuge, NF 1200/1200R, 14000 rpm), por 15 minutos. As frações do sobrenadante foram filtradas em papel de filtro e os volumes completados para 20 mL. Os extratos foram armazenados em frascos âmbar e armazenados em freezer a -18 °C. Alíquotas dos extratos foram utilizadas nos testes antioxidantes e para a estimativa do conteúdo de fenólicos totais.

##### **4.7.2 Estimativa da concentração de fenólicos totais**

A concentração de fenólicos totais nos extratos foi estimada utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, de acordo com a metodologia proposta por Singleton et al. (1999). Foram adicionados em tubos de ensaio 500 µL do extrato, 500 µL de reagente de Folin-Ciocalteu a 20% diluído em água (Sigma-Aldrich, Alemanha) e 500 µL de solução de carbonato de sódio a 7,5% (diluído em água). Foi realizada a agitação em vórtex (Bio Vórtex V1 BIOSAN®) e, em seguida, a amostra foi deixada para reagir por 30 minutos. A absorbância foi lida em espectrofotômetro (Thermo Scientific, Evolução 60S, EUA), em comprimento de onda de 765 nm. Uma curva analítica foi construída a partir da leitura da absorbância de soluções com diferentes concentrações (0,005-0,10 mg/mL) de ácido gálico (Sigma-Aldrich, Alemanha). Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra (mg EqAG/g de amostra).

##### **4.7.3 Determinação da capacidade antioxidante**

A capacidade antioxidante das amostras foi determinada a partir do extrato preparado para a análise de fenólicos totais, utilizando o método do radical DPPH (2,2-difenil-2-picril-hidrazila) (BLOOR, 2001). Uma alíquota de 100 µL do extrato foi adicionada de 1500 µL de solução metanólica de DPPH (Sigma-Aldrich, Alemanha) 0,1 mM (1,0 mL). Foi realizada a agitação em vórtex e, em seguida, o extrato foi deixado em repouso por 30 minutos, ao abrigo da luz. A absorbância foi lida em espectrofotômetro (ThermoScientific, Evolution 60S, EUA) a 517 nm e os resultados foram expressos em mmol trolox/g.

#### 4.8 Determinação e quantificação de aminoácidos

As análises dos aminoácidos presentes nas amostras foram realizadas no laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos. O perfil de aminoácidos foi determinado de acordo com os métodos 994.12/2000 (AOAC 2000) e Liu et al. (1995). Para a determinação dos aminoácidos foram feitas duas hidrólises: ácida e ácida com prévia oxidação com ácido permórfico. As hidrólises foram conduzidas em ampolas de vidro seladas sob vácuo e mantidas à 110 °C por 20h, em seguida aminoácidos sulfurados e os resistentes à hidrólise ácida foram derivatizados com 6- aminoquinolil-succimidil-carbamato (AQC). As análises foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detector de fluorescência acoplado de coluna de separação de fase reversa. Os dados foram expressos em g de aminoácido em 100 g de amostra.

O escore de aminoácidos para cada aminoácido essencial foi calculado com base no padrão sugerido de requisitos de aminoácidos pela FAO para adultos (FAO, 2011). O aminoácido com a pontuação mais baixa indica o primeiro aminoácido limitante.

O escore químico de aminoácidos foi calculado usando a fórmula:

$$\text{Escore de aminoácidos} = \frac{\text{mg aminoácido em 1 g de proteína no alimento}}{\text{mg de aminoácido em 1 g de proteína de referência}}$$

#### 4.9 Digestibilidade proteica *in vitro*

O método de queda de pH foi utilizado para avaliação da digestibilidade proteica *in vitro* (MENDES et al., 2016). Uma solução enzimática contendo as enzimas tripsina bovina (Sigma-Aldrich, CAS nr. 9001-75-6, 3200-4500 units/mg protein) (2,5 mg/mL) e pancreatina suína (Sigma-Aldrich CAS nr. 8049-47-6) (1,6 mg/mL) foi utilizada para promover a hidrólise das proteínas.

Um volume de 50 mL de suspensão proteica foi preparado em água destilada (6,25 mg de proteína/mL), ajustado para pH 8 com uma solução de NaOH e submetido a agitação e controle de temperatura (37°C). Uma alíquota de 5 mL da solução enzimática foi adicionada à suspensão protéica e mantida a 37°C em banho-maria. A diminuição do pH foi aferida após 10 minutos usando um pHmetro digital. O cálculo de digestibilidade foi realizado de acordo com equação proposta por Mendes et al. (2016).

#### 4.10 Grau de hidrólise

Para a determinação do grau de hidrólise (GH) foi realizada a comparação da proteína digerida enzimaticamente com uma amostra completamente hidrolisada quimicamente. Um miligrama de proteína da farinha de inseto foi acrescentado a 1 mL de ácido sulfúrico 2 N e colocado em banho-maria fervente por 4 horas.

A amostra digerida quimicamente foi adicionada a 1 mL de água destilada (96° C), sonificada por 10 minutos, adicionada de 5 ug de ácido tricloroacético (TCA) e centrifugado por 30 min a 4°C e 20.000 rpm. O sobrenadante foi extraído e diluído a 1:20 para plaqueamento.

Posteriormente, a concentração de proteína foi determinada por *Bradford Protein Assay* (BPA) (BRADFORD, 1976) usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

O grau de hidrólise foi calculado pela seguinte equação:

$$\text{Grau de hidrólise} = \frac{\text{Concentração de proteína após digestão enzimática}}{\text{Concentração de proteína após digestão química}}$$

#### 4.11 Determinação do perfil das proteínas

A distribuição do peso molecular das proteínas foi determinada por eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE). As amostras foram dissolvidas em tampão Tris 0,1 M, adicionadas de 0,5% de SDS a 10%, agitadas em vórtex e incubadas durante cinco minutos a 90°C. As amostras foram executadas com 12% (Tris-Glicina) gel com um marcador padrão na faixa de 10–250 kD (Biorad). A intensidade da banda das amostras foi estimada após a coloração dos géis com *Coomassie Brilliant blue*.

#### 4.12 Solubilidade proteica em função do pH

A solubilidade da proteína em função do pH foi determinada como descrito por MISHYNA et al. (2019), com algumas modificações. As amostras (0,2 g) foram dispersas em água destilada (10 mL) e o pH foi ajustado em 3, 5, 7, 9 e 11, por meio da adição de NaOH 1 M ou HCl 1 M. A dispersão foi agitada em um agitador magnético por uma hora a 40°C. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 3000 g por 20 min, os sobrenadantes foram coletados para medição da concentração de proteína usando o método de Bradford (BRADFORD, 1976). A solubilidade da proteína foi calculada como uma razão entre a proteína solúvel no sobrenadante e o conteúdo total de proteína no tipo de farinha correspondente.

A solubilidade proteica foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{Solubilidade (\%)} = \frac{\text{Concentração de proteína no sobrenadante}}{\text{Concentração de proteína da amostra}} \times 100$$

#### 4.13 Análises estatísticas

Todos os dados foram analisados estatisticamente usando o software IBM SPSS 22.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, EUA). Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância unidirecional (ANOVA) determinando diferenças significativas entre as médias pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Para a comparação intra espécie de acordo com o estágio de desenvolvimento, foi conduzido o teste t de Student para amostras independentes. A variabilidade média dos dados foi indicada pelo desvio padrão.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEMLA, M.; SINGH, H. K. Utilization of insects as human food in Nagaland. **Indian Journal of Entomology**, v. 66, n. 4, p. 308, 2004.

ARAÚJO, R. R. S. et al. Nutritional composition of insects *Gryllus assimilis* and *Zophobas morio*: Potential foods harvested in Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 76, p. 22-26, 2019

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (19th ed.). Gaithersburg:AOAC. 2012.

BARBOSA, L. R. et al., Caracterização de Danos de *Gryllus* sp. em Plantas de Eucalipto, em Laboratório. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n. 59, p. 63-63, 2009.

BARENNE, H. et al., Insect consumption to address undernutrition, a national survey on the prevalence of insect consumption among adults and vendors in Laos. **PloS one**, v. 10, n. 8, p. e0136458, 2015.

BATAT, W. PETER, P. The healthy and sustainable bugs appetite: factors affecting entomophagy acceptance and adoption in Western food cultures. **Journal of Consumer Marketing**, 2020.

BESSA, L.W. et al. Insects as human food; from farm to fork. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, n. 14, p. 5017-5022, 2020.

BHAT, et al., In vitro meat production: Challenges and benefits over conventional meat production. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 14, n. 2, p. 241-248, 2015.

BLOOR, S. J. Overview of methods for analysis and identification of flavonoids. **Methods in Enzymology**, 335, 3–14. 2001

BODENHEIMER, F.S. Insects as Human Food: A Chapter of the Ecology of Man, Springer, Dordrecht. 1951.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/942051/>>. Acesso em: 11 ago. 2022.

BUKKENS, S.G.F.. Insects in the human diet. In *Ecological Implications of Minilivestock: Potential of Insects, Rodents, Frogs and Snails*, ed. MG Paoletti, pp. 545–77. Enfield, NH: Science Publ. Provides an overview of human entomophagy, with an emphasis on nutritional aspects. 2005.

BUCHHOLZ, A. C., SCHOELLER, D. A. Is a calorie a calorie?, **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.79, n. 5, p. 899S–906S.

ÇABUK, B; YILMAZ, B. Fortification of traditional egg pasta (erişte) with edible insects: Nutritional quality, cooking properties and sensory characteristics evaluation. **Journal of food science and technology**, p. 1-8, 2020.

CARRERA, M. Entomofagia humana. **Revista Brasileira de Entomologia**, 36. 1992.

CHAKRAVORTY J. et al., Nutritional composition of *Chondacris rosea* and *Brachytrupes orientalis*: two common insects used as food by tribes of Arunachal Pradesh, India. **J Asia Pac Entomol** . 17:407–415 2014.

COSTA-NETO, E. M.; PACHECO, J. M. "Head of snake, wings of butterfly, and body of cicada": impressions on the lantern fly (Hemiptera: Fulgoridae) in the village of Pedra Branca, Bahia State, Brazil. **Journal of Ethnobiology**, 23 (1): 23-46. 2003.

CRUZ, F.M. et al., “Fearing the enemy”: Growth and stress biomarker responses of sexually reversed *Oreochromis niloticus* in the presence of aquatic predatory insects. **Physiol. Behav.** 113202. 2020.

DEFOLIART, G.R.. The human use of insects as food resource: a bibliographic account in progress. Wisconsin, USA: Department of Entomology, University of Wisconsin-Madison. Disponível em: [www.foodinsects.com/book7\\_31/The% 20 Human% 20 Use% 20of% 20Insects% 20as% 20a% 20Food% 20Resource. htm](http://www.foodinsects.com/book7_31/The%20Human%20Use%20of%20Insects%20as%20a%20Food%20Resource.htm)). 2002

FAO. Dietary protein quality evaluation in human nutrition Report of an FAO Expert Consultation. . Auckland: [s.n.] , 2011

FAO. How to feed the world in 2050. Paper presented at the High Level Expert Forum, Rome, Italy, 12–13 October. Disponível em [www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert\\_paper/How\\_to\\_Feed\\_the\\_World\\_in\\_2050.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf)). 2009

FAO/WUR (2014). Insects to feed the world: summary report. In P. Vantomme, C. Münke, A. van Huis, J. van Itterbeeck, & A. Hakman (Eds.), *Insects to Feed the World*. Ede, Netherlands.

FAO; PROGRAMME, World Food. The state of food insecurity in the world. *Notes*, p. 1–61, 2009. Disponível em: <<https://digitalibrary.un.org/record/3927682>>. Acesso em: 14 ago. 2022

FENG, S. *Tenebrio molitor* L., entomophagy and processing into ready to use therapeutic ingredients: a review. **J. Nutr. Health Food Eng**, v. 8, p. 280-285, 2018.

GERBER P.J et al., Tackling climate change through livestock - a global assessment of emissions and mitigation opportunities. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome 2009.

GHALY, A. E. et al. The yellow mealworm as a novel source of protein. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v. 4, n. 4, p. 319-331, 2009.

GOMES, J. C.; OLIVEIRA, G. F. Fotometria de chama e espectrofotometria de absorção atômica. In: GOMES, J. C. e OLIVEIRA, G. F. (Ed.). *Análises físico-químicas de alimentos*. Viçosa: UFV, 2011, 244 p.

GRAVEL, A.; DOYEN, A. The use of edible insect proteins in food: Challenges and issues related to their functional properties. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 59, p. 102272, 2020.

HANBOONSONG, Y. et al., Six-legged livestock: edible insect farming, collecting and marketing in Thailand. Bangkok: Food and Agriculture Organization of the United Nations Regional Office for Asia and the Pacific. 2013.

HERRERO, Mario et al. Livestock and the environment: what have we learned in the past decade?. **Annual Review of Environment and Resources**, v. 40, 2015.

- JANSSEN R.H., et al., Nitrogen-to-protein conversion factors for three edible insects: *Tenebrio molitor*, *Alphitobius diaperinus*, and *Hermetia illucens*. **J Agric Food Chem** 65:2275–2278. 2017.
- JENSEN, K. et al. Breeding and maintaining high-quality insects. *Insects as Food and Feed: From Production to Consumption*; van Huis, A., Tomberlin, JT, Eds, p. 174-198, 2017.
- JEON, Y. et al. Physicochemical properties and oxidative stabilities of mealworm (*Tenebrio molitor*) oils under different roasting conditions. **Food science and biotechnology**, v. 25, n. 1, p. 105-110, 2016.
- KOMPRDA, T. et al. The effect of dietary *Salvia hispanica* seed on the content of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in tissues of selected animal species, including edible insects. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 32, n. 1, p. 36-43, 2013.
- LIMBERGER, G. M. Análise morfofisiológica associada à reprodução e envelhecimento de *Gryllus assimilis* (Fabricius, 1775)(Orthoptera: Gryllidae). 2018. Dissertação de Mestrado.
- LIU H. J. et al. Determination of Amino Acids in Food and Feed by Derivatization with 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate and Reversed-Phase Liquid Chromatographic Separation, **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v.78, 3, 1995.
- LOCKWOOD, J.Á. *Locust: The Devastating Rise and Mysterious Disappearance of the Insect That Shaped the American Frontier*, Basic Books, New York, NY. 2014.
- LUCAS, A.J. et al. Edible insects: An alternative of nutritional, functional and bioactive compounds. **Food chemistry**, v. 311, p. 126022, 2020.
- MACHADO, C. D. R. et al., Cricket powder (*Gryllus assimilis*) as a new alternative protein source for gluten-free breads. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 56, p. 102180, 2019.
- MELGAR-LALANNE, G.; HERNÁNDEZ-ÁLVAREZ, A; SALINAS-CASTRO, A. Edible insects processing: Traditional and innovative technologies. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, n. 4, p. 1166-1191, 2019.
- MENDES, Q F et al., Capability of in vitro digestibility methods to predict in vivo digestibility of vegetal and animal proteins. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 66(1), p.005-016, 2016.
- MERA R, et. al., How to Calculate Sample Size for an Experiment: A Case-Based Description. *Nutritional Neuroscience*.;1(1):87-91. 1988.
- MITSUHASHI J. The future use of insects as human food, in *Forest Insects as Food: Humans Bite Back*, ed. by Durst PB, Johnson DV, Leslie RN and Shono K. FAO Regional Office for Asia and the Pacific, Bangkok, pp. 115–122. 2010.
- MITSUHASHI, Jun. **Edible insects of the world**. CRC press, 2016.
- MONTOWSKA, M. et al. Nutritional value, protein and peptide composition of edible cricket powders. **Food Chemistry**, v. 289, p. 130-138, 2019.
- OCHIAI, M. et al., Nutritional and safety evaluation of locust (*Caelifera*) powder as a novel food material. **Journal of food science**, v. 85, n. 2, p. 279-288, 2020.

- OHBA, Shin-ya. Ecology of giant water bugs (Hemiptera: Heteroptera: Belostomatidae). **Entomological Science**, v. 22, n. 1, p. 6-20, 2019.
- OONINCX, D. G. A. B. et al. An exploration on greenhouse gas and ammonia production by insect species suitable for animal or human consumption. **PloS one**, v. 5, n. 12, p. e14445, 2010.
- PENNINO, M et al., Retinol,  $\alpha$ -tocopherol and proximate nutrient composition of invertebrates used as feed. **International Zoo Yearbook**, 30(1), 143–149. 2007.
- PHILLIPS, J., BURKHOLDER, W., Allergies related to food insect production and consumption. **Food Insects News**. 1. 8, 1– 2, 1995.
- PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. et al. Carotenoid retention and vitamin A value in carrot (*Daucus carota* L.) prepared by food service. **Food Chemistry**, v.61, n. 1-2, p.145-151, 1998.
- PINHEIRO-SANT'ANA, H. et al. stability of b-vitamins in meats prepared by foodservice. 2. riboflavin. **Foodservice Research International**, v. 11, n. 1, p. 53-67, 1999.
- PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. et al. Stability of B-vitamins in meats prepared by foodservice. 3. Nicotinic Acid. **Foodservice Research International**, v. 11, n. 1, p. 69-82, 1999.
- PINHEIRO-SANT'ANA, G. et al. Method for simultaneous analysis of eight vitamin E isomers in various foods by high performance liquid chromatography and fluorescence detection. **Journal of Chromatography**. v. 1218, n. 47, p. 8496-8502, 2011.
- POSHADRI, A. et al. Insects as an Alternate Source for food to conventional food animals. **International Journal of Pure & Applied Bioscience**, v. 6, n. 2, p. 697-705, 2018.
- RAUBENHEIMER, D, ROTHMAN, J. M. Nutritional ecology of entomophagy in humans and other primates. **Annual review of entomology**, v. 58, p. 141-160, 2013.
- REHMAN, A. et al. Towards environmental Sustainability: Devolving the influence of carbon dioxide emission to population growth, climate change, Forestry, livestock and crops production in Pakistan. **Ecological Indicators**, v. 125, p. 107460, 2021.
- RIBEIRO, J. R. I. et al., Phylogenetic analysis and revision of subfamily classification of Belostomatidae genera (Insecta: Heteroptera: Nepomorpha). **Zoological Journal of the Linnean Society**, 182(2), 319-359. 2018.
- RONCOLINI, A. et al. Protein fortification with mealworm (*Tenebrio molitor* L.) powder: Effect on textural, microbiological, nutritional and sensory features of bread. **PloS One**, v. 14, n. 2, p. e0211747, 2019.
- RUMPOLD, Birgit A.; SCHLÜTER, Oliver K. Nutritional composition and safety aspects of edible insects. **Molecular nutrition & food research**, v. 57, n. 5, p. 802-823, 2013.
- SCHMIDT, Anatol et al. Determination of vitamin B12 in four edible insect species by immunoaffinity and ultra-high performance liquid chromatography. **Food chemistry**, v. 281, p. 124-129, 2019.
- SIEMIANOWSKA, E. et al. Larvae of mealworm (*Tenebrio molitor* L.) as European novel food. 2013.
- SINGLETON, V. L., ORTHOFER, R., LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, 299, 152–178. 1999

- SINGSON L et al., Edible insects of Nagaland and its nutritional benefit. **Periodic Res**, v. 5, p. 1-7, 2016.
- SMETANA S et al., Sustainability of insect use for feed and food: life cycle assessment perspective. **J Clean Prod**.137:741–751. 2016.
- SMETANA S. et al., Meat alternatives: life cycle assessment of most known meat substitutes. **Int J Life Cycle Assess** 20:1254–1267. 2015.
- SMIL, Vaclav. Worldwide transformation of diets, burdens of meat production and opportunities for novel food proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 3, p. 305-311, 2002.
- SOGARI, G. Entomophagy and Italian consumers: an exploratory analysis. **Progress in Nutrition**, v. 17, n. 4, p. 311-316, 2015.
- SOUZA C. D. et al. An invertebrate host to study fungal infections, mycotoxins and antifungal drugs: *Tenebrio molitor*. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 4, p. 125, 2018.
- SPRANGHERS, T. et al. Nutritional composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) prepupae reared on different organic waste substrates. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 8, p. 2594-2600, 2017.
- STARČEVIĆ, K. et al. Influence of substitution of sunflower oil by different oils on the growth, survival rate and fatty acid composition of Jamaican field cricket (*Gryllus assimilis*). **Animal Feed Science and Technology**, v. 228, p. 66-71, 2017.
- STEINFELD H. et al., Livestock's long shadow. Environmental issues and options. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO, Rome). 2006.
- SUTTON, M. Q. Aboriginal Tasmanian entomophagy. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ETHNOBIOLOGY, 1., 1988, Belém. Ethnobiology: Implications and applications, Belém: MPEG, 1988. p. 209-217.
- SWART, C. et al., The salivary gland and salivary enzymes of the giant waterbugs (Heteroptera; Belostomatidae). Comparative Biochemistry and Physiology Part A: **Molecular & Integrative Physiology**, 145(1), 114-122. 2006.
- TICHA, A. et al., PP130 evaluation of amaranth protein quality in an experimental animal model. **Clinical Nutrition Supplements**, 5(2), 2010.
- United Nations (UN), World population projected to reach 9.6 billion by 2050 – UN report [Online]. Disponível em: <http://www.un.org/apps/news/story.asp?NewsID=45165#.V6or25h97b0>
- VALBON H. K. et al., “Armed to the teeth”: The multiple ways to survive insecticidal and predatory challenges in *Aedes aegypti* larvae. **Pestic. Biochem. Physiol.** 156, 87–95. 2019
- VALBON, et al., Sublethal exposure to deltamethrin reduces the abilities of giant water bugs to prey upon *Aedes aegypti* larvae. **Chemosphere** 191, 350–356. 2018.
- VAN HUIS, A. Potential of insects as food and feed in assuring food security. **Annual review of entomology**, v. 58, p. 563-583, 2013.
- VAN HUIS, A. Edible insects are the future? **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 75, n.3, p. 294-305, 2016.

VAN HUIS, A. OONINCX, D. G.A.B. The environmental sustainability of insects as food and feed. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 37, n. 5, p. 1-14, 2017.

VANDEWEYER, D. et al. Effect of blanching followed by refrigerated storage or industrial microwave drying on the microbial load of yellow mealworm larvae (*Tenebrio molitor*). **Food Control**, v. 71, p. 311–314., 2017.

WILLIAMS, D.; WILLIAMS, S. S. Aquatic insects and their potential to contribute to the diet of the globally expanding human population. **Insects**, v. 8, n. 3, p. 72, 2017.

YONG-WOO, L. Silk reeling and testing manual. FAO Agricultural Services Bulletin, 136. 1999.

ZERA, A.J. POTTS, J.; KOBUS, K. The physiology of life-history trade-offs: experimental analysis of a hormonally induced life-history trade-off in *Gryllus assimilis*. **The American Naturalist**, v. 152, n. 1, p. 7-23, 1998.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 ARTIGO 1:

#### **Digestibility and quality of edible insect proteins: A systematic review of *in vivo* studies**

Edible insects can be considered a potential food source to respond to global food security concerns in a sustainable manner and in sufficient quantities to feed the world's growing population. However, there is no consensus on its quality and biological protein value. Therefore, we reviewed *in vivo* studies that evaluated parameters related to the consumption of edible insects in order to clarify their potential as a source of high quality protein. We searched PubMed/MEDLINE, Scopus, Web of Science, and Embase databases, and analyzed only original studies, according to the PRISMA guidelines. The included studies were limited to those that evaluated protein quality in rats or mice. A total of 10 studies were selected. Most studies found weight gain equal to or greater than the observed in the control group. The values for food intake, net protein ratio (NPR), and biological value (BV) were also similar to those in the control group. True digestibility (TD) and protein efficiency ratio (PER) were mostly lower in animals fed with insects, and higher nitrogen excretion was observed. Due to the high heterogeneity of the results of this systematic review, it cannot be concluded that the insects have high protein quality, although positive results regarding weight gain and biological value have been found. This study is registered with Prospero number CRD42022345824.

**Keywords:** protein quality; digestibility; edible insects; entomophagy

## 1. Introduction

A global concern about imminent issues related to the production of food in a sustainable way and in sufficient quantity to feed the entire world population. Demographic studies point to an increase in the world population to 9.6 billion by 2050<sup>[1]</sup>. Thus, food, mainly those sources of protein, needs increase considerably in the coming years<sup>[2]</sup>.

Dietary proteins provide amino acids for the synthesis of plasma proteins, which are essential for maintaining osmotic balance and immunity and transporting substances. Proteins also play an important role in the synthesis of enzymes and hormones. In view of the nutritional and physiological importance of proteins and their amino acids, there has been growing interest in identifying alternative protein sources that meet the indispensable amino acid requirements (IAA) of humans and animals<sup>[3]</sup>.

In this sense, edible insects can be considered a potential food source to respond to global food security concerns, as well as a good alternative to meet the increased demand for proteins<sup>[1, 4]</sup>. In addition, the act of consuming insects as a food source (entomophagy) may have advantages related to the high nutritional value of insects and their protein content<sup>[5, 6]</sup>. However, there is a need to qualify them as a source of high quality protein, through the evaluation of their bioavailability, amino acid profile, and protein digestibility.

Although insect proteins have been studied frequently, there is no consensus on their quality or biological value. Therefore, we reviewed *in vivo* studies that evaluated parameters related to the consumption of edible insects in order to clarify their potential as a source of high quality protein.

## 2. Methodology

### 2.1 Protocol and registration

This systematic review was guided by the following question: “Do insect proteins have high protein quality and digestibility?”. This review was developed in accordance with the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) guidelines<sup>[7]</sup>. The systematic review protocol used in this study was registered in the International Prospective Register of Systematic Reviews (PROSPERO).

### 2.2 Eligibility criteria

This review included studies that evaluated *in vivo* parameters related to the digestibility and quality of proteins from edible insects. The following criteria were used to exclude articles:

review articles, book chapters, studies that did not assess parameters of interest and studies carried out with birds, fish, and swine. The participants, intervention comparators, results, and study design criteria (PICOS) adopted in this study are shown in Table 1.

**Table 1.** PICOS criteria for the inclusion of studies.

<b>Parameter</b>	<b>Inclusion criteria</b>
Population	<i>In vivo</i> studies using rats and mice.
Intervention or exposure	Ingestion of edible insects as a partial or total source of protein
Comparison	Control (without intervention)
Outcome	DIAAS (Digestible Indispensable Amino Acid Score, Protein Efficiency Ratio (PER), <i>In Vivo</i> Apparent Protein Digestibility (AD), protein digestibility, protein digestibility corrected for amino acid score (PDCAAS) true digestibility (TD), Net protein utilization (NPU) and Biological value (BV).
Study design	Experimental studies

### 2.3 Search

Various electronic databases, including MEDLINE (via PubMed PubMed/MEDLINE (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), Scopus (<https://www.scopus.com/home.uri>), Web of Science (<https://www.webofknowledge.com>) and Embase (<https://www.embase.com>) were searched to find all available articles on the topic published to date. There was no restriction regarding the language and publication date of the researched articles.

Besides, the snowball method was used to find additional articles. The reference list or citations from the selected articles were used to identify other relevant studies. Then, the selected works were compared, and differences were resolved in consultation between the authors. The last search date was May 8, 2022.

Combinations of the following search terms were used: protein digestibility, protein quality, edible insect, true protein digestibility, net protein retention, true digestibility, nitrogen balance, digestible indispensable amino acid score and protein digestibility corrected amino acid score. Details on the research strategy are provided in the supplemental material (Table S1).

The filters of the PubMed/MEDLINE platform were constructed through a hierarchical distribution of MeSH (Medical Subject Headings) terms. These filters were adapted for surveys on the Scopus platform, Web of Science and Embase.

#### ***2.4 Selection of studies***

Six authors (KAD, LAO, SMSP, LCOSV, MB) independently selected eligible studies after reviewing their titles and abstracts. The level of agreement between the authors was assessed using the kappa index (kappa= 0.95). After reading titles, abstracts and full-text analysis, we included all studies performed *in vivo* that evaluated parameters related to the quality and digestibility of edible insect proteins.

#### ***2.5 Data extraction***

After selecting the included studies, data from the publications were extracted using standardized information, such as the name of the authors, year of publication, the country where the study was performed, insect used, animal model, study protocol, follow-up, intervention characteristics and primary and secondary outcomes. After the data extraction step, the researchers compared the data to ensure integrity and reliability.

#### ***2.6 Risk of Bias***

The quality assessment of the included studies was independently performed by the authors, using the SYRCLE Risk of Bias (RoB) methodology<sup>[8]</sup>. The SYRCLE checklist consists of 10 items to assess different types of bias (attrition bias, selection bias, detection bias, reporting bias, performance bias and other biases). Possible answers for each item are yes, no, and not clear, which indicate low risk, high risk and unclear risk of bias, respectively.

#### ***2.7 Data analysis***

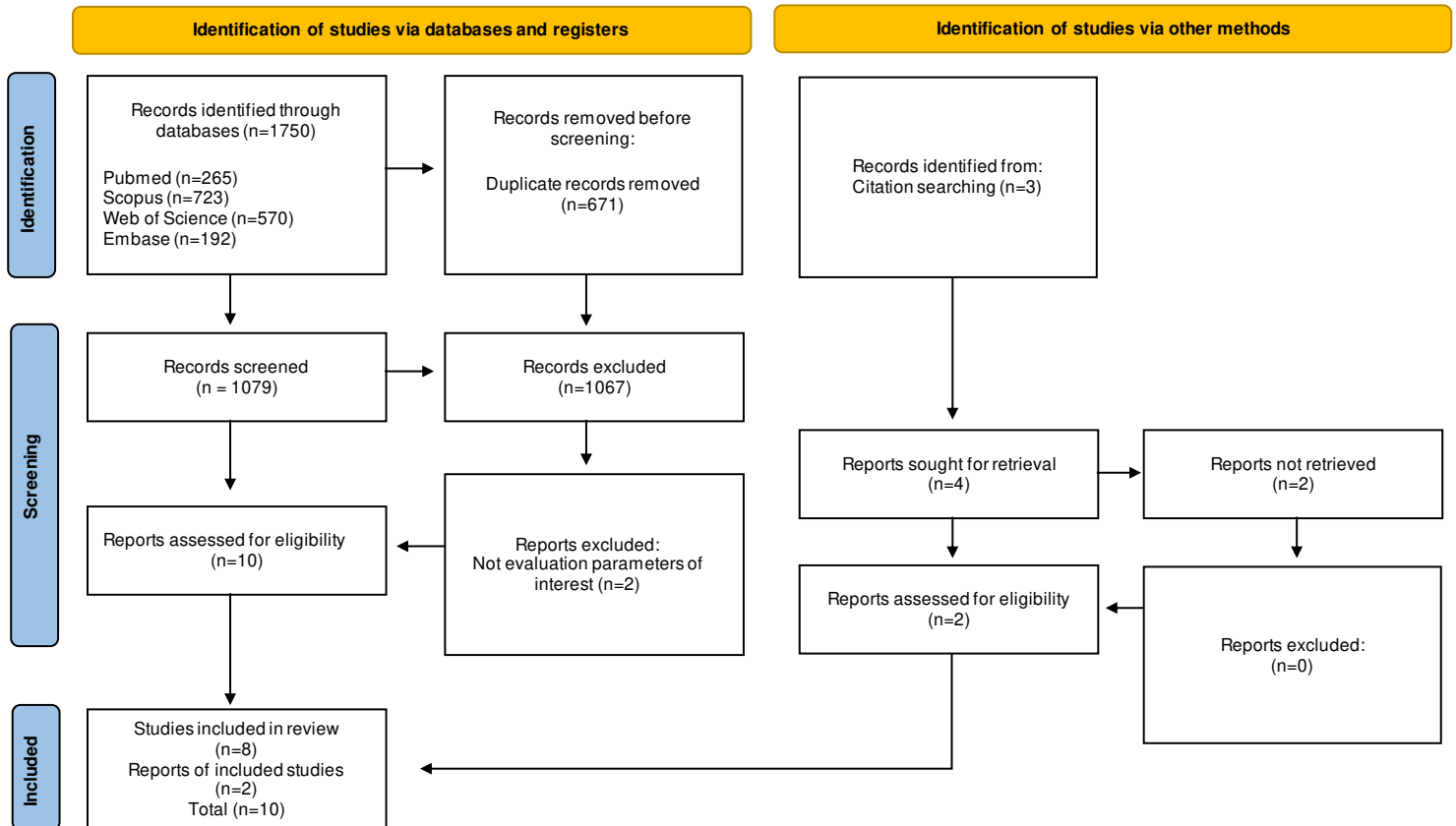
All studies reviewed in this article were summarized in a standard data extraction model, according to the main characteristics and results obtained (Table 2). The studies were chronologically ordered by year of publication.

## **2. Results**

### ***3.1 Selection of studies***

Flowchart with the number of articles selected and excluded at each stage was built according to PRISMA guidelines (Figure 1). After searching PubMed, Scopus, Web of Science and Embase, we identified 1750 articles. Subsequently, 671 duplicates were removed, resulting in 1079 articles, of which 1067 were excluded after the titles and abstracts were read. After

reading full text, we excluded 2 articles that did not evaluate the parameters of interest, namely, growth performance and weight gain, protein digestibility and efficiency, feed efficiency coefficient, nitrogen excretion, and amino acid profile. In addition, we performed a citation search to identify other relevant studies and included two articles that met the eligibility criteria. Finally, 10 articles were included in this review.



**Figure 1:** PRISMA diagram. Different phases of the selection of studies for conducting qualitative and quantitative analyses. Flow diagram of the systematic review literature search results. Based on [18] Systematic review

### 3.2 Characteristics of the included studies

The 10 studies that compose this review investigated 387 animals, including rats and mice, aged 3 to 7 weeks. Sample size ranged from 18 to 70 animals, and the intervention time ranged from 9 days to 4 weeks. The included studies (n=10) were carried out in nine different countries, namely, Korea, Zimbabwe, Denmark, Belgium, Russia, USA, Nigeria, Lithuania, and Brazil.

Regarding the animal model used in the studies, most used rats (n=9; 90%)<sup>[6, 9–16]</sup>. Only one study was carried out with mice (n=1; 10%)<sup>[17]</sup>. Most studies used male animals (n=9; 90%)<sup>[6, 9–16]</sup>, and only one study (10%) was carried out with mice of both sexes<sup>[17]</sup>. The main characteristics of the studies were chronologically organized by year of publication, starting from the first published article.

In all included studies (n=10, 100%), test groups were offered crushed insects mixed with other ingredients of the diet, as a source of protein. Regarding the control group, all studies included used casein as a protein source, with the exception of Jensen et al., (2019)<sup>[10]</sup>, who did not include a control group. Five studies (50%) evaluated only one type of insect and another five studies (50%) evaluated more than one type of insect in the same study. Thus, the following insects were studied: *Imbrasia belina*, *Locusta migratoria*, *Encosternum delegorguei*, *Alphitobius diaperinus*, *Acheta domesticus*, *Clanis bilineata*, *Gryllus assimilis*, *Melanoplus foedus*, *Macrotermes nigierensis*, *Macrotermis belicosu*, *Cirina forda* and larvae of *Allomyrina dichotoma*, *Hermetia illucens*, *Oryctes rhinoceros*, *Imbrasia belina* larvae, *Rhynchophorus phoenicis*, and *Tenebrio molitor*.

The protein content found in the insects ranged from 22.06 to 75.5% in relation to their dry weight. The lowest protein content was found by Ekpo (2011)<sup>[16]</sup> for *Rhynchophorus phoenicis* larvae (22.06%). *Tenebrio molitor* larva presented the highest protein content among the insects studied (75.5%)<sup>[11]</sup>.

Most of the included studies used insects in their entirety. Three studies (37.5%) applied some type of processing<sup>[6, 10, 11]</sup>, like Traksele et al. (2021)<sup>[6]</sup> that used defatted larvae biomass. Jensen et al. (2019)<sup>[10]</sup>, applied seven different treatments to the insects *Alphitobius diaperinus* and *Tenebrio molitor*, namely: freeze-dried, defatted, extruded, formic acid hydrolysed, industrial-dried, vacuum-dried and addition of an enzyme blend to the freeze-dried product. Finally, Poelaert et al. (2018)<sup>[11]</sup>, compared not heated insects with heat treatment insects in an oven or autoclave.

### 3.3 Food intake and performance growth

Four studies included in this systematic review found no differences in weight or body weight gain between the animals in the control group that received casein and the animals that received insects as a source of protein in the diet<sup>[6, 9, 12, 17]</sup>. In contrast, two studies reported less weight gain in the test group<sup>[15, 16]</sup>, and one study observed that the control diet allowed better results for animal growth performance, as highlighted by the higher daily weight gain and the lower feed conversion ratio<sup>[11]</sup>. Thus, animals fed *Acheta domesticus* and *Tenebrio molitor* presented lower growth performance rate<sup>[11]</sup>.

In contrast, Inje et al. (2018)<sup>[14]</sup> and Xia et al. (2012)<sup>[13]</sup> observed greater weight gain in rats fed protein derived from crickets and *Clanis bilineata larvae*, respectively, compared to the control group. In the experiment by Choi et al. (2020)<sup>[9]</sup>, food intake of the test group was higher than that of the control group. However, most studies have not reported significant differences in food consumption between insect-fed and standard diet groups<sup>[12, 15, 17]</sup>, while Ekpo (2011)<sup>[16]</sup> observed lower feed consumption among rats fed diets composed of *Oryctes rhinoceros*, *Imbrasia belina*, and *Macrotermes bellicosus*.

In the study by Chagwena et al. (2019)<sup>[17]</sup>, animals fed with insects and the control group presented similar protein intake. On the other hand, Xia et al. (2012)<sup>[13]</sup>, observed that the test group achieved higher protein intake (16.8g/day) when compared to the control group (12.9g/day).

**Table 2.** Characteristics of the studies included

References	Country	Insect	Animal model	Protein dosage	Study protocol	Follow-up	Main results
Ekpo, K.E., 2011	Nigeria	<i>Oryctes rhinoceros</i> larva, <i>Imbrasia belina</i> larva, <i>Macrotermis belicosus</i> and <i>Rhynchophorus pheonicis</i> larva.	36 male albino rats (Wistar strain) 23 days old	10%	(n=6/group)  G1: Control (casein); G2: Protein-free diet; G3: <i>Oryctes rhinoceros</i> larva; G4: <i>Imbrasia belina</i> larva; G5: <i>Macrotermis belicosus</i> ; G6: <i>Rhynchophorus pheonicis</i> larva.	28 days	↓ Weight gain  ↔ NPR, PER, TD  ↑ ALT and AST (G4 vs. G1) ↔ ALT and AST (G2, G3, G5 and G6 vs. G1)
Xia et al., 2012	USA	<i>Clanis bilineata</i>	18 male Wistar rats 3 weeks of age	10%	(n = 6/group)  G1: Control (casein); G2: Protein free diet. G3: CBP ( <i>Clanis bilineata</i> protein).	10 days	↑ Protein intake ↑ Body weight gain ↑ Essential amino acids ↔ NPR, TD and NB
Inje et al., 2018	Nigeria	<i>Gryllus assimilis</i> , <i>Melanoplus foedus</i> , <i>Macrotermes nigierensis</i> , and <i>Cirina forda</i>	36 young male albino rats 3 to 4 weeks of age	10%	(n = 6/group)  G1: Control (casein); G2: Protein-free diet; G3: <i>Gryllus assimilis</i> ; G4: <i>Melanoplus foedus</i> ; G5: <i>Macrotermes nigierensis</i> ; G6: <i>Cirina forda</i> .	28 days	↑ Body weight ↑ PER (cricket vs casein) ↓ PER (G3, G5, G6 vs. G2 and G4) ↓ NPR (G5 vs. G2) ↔ NPR (G3, G4 and G6 vs. G2) ↓ TD (G3, G4, G5 and G6 vs. G2) ↑ TD (G5 vs. G3, G4 and G6) ↔ NPU ↑ Biological value ↑ ALT and AST (G4 and G5 vs. G1) ↔ ALT and AST (G3 and G6 vs. G1)

Poelaert et al., 2018	Belgium	House crickets ( <i>Acheta domesticus</i> ) and the larvae of mealworms ( <i>Tenebrio molitor</i> ).	70 male rats Sprague-Dawley	10%	(n = 7/group)	19 days	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ Performance growth</li> <li>↓ AAS</li> <li>↓ PER</li> <li>↑ Feed conversion ratio</li> <li>↓ TDP</li> <li>↓ Nitrogen retention</li> </ul>
Chagwena et al., 2019	Zimbabwe	<i>Imbrasia belina</i> , <i>Locusta migratoria</i> , and <i>Encosternum</i> <i>delegorguei</i> .	24 males and females mice Balb C 3 weeks old	8%	(n = 6/group)	20 days	<ul style="list-style-type: none"> <li>↔ Feed intake</li> <li>↔ Protein Intake</li> <li>↔ Total weight gain</li> <li>↓ PER</li> <li>↔ Feed Intake</li> <li>↔ Nitrogen consumed</li> <li>↔ Nitrogen dried feces</li> <li>↓ Apparent digestibility</li> <li>↔ Body weight</li> <li>↔ NB</li> <li>↔ Apparent and true crude protein digestibility.</li> <li>↔ Biological value</li> </ul>
Jensen et al., 2019	Dinamarca	<i>Alphitobius</i> <i>diaperinus</i> and <i>Tenebrio molitor</i>	48 male rats Sprague-Dawley	10%	(n=4-6/group)	17 days	<ul style="list-style-type: none"> <li>G1: TM freeze-dried</li> <li>G2: AD freeze-dried</li> <li>G3: AD defatted</li> <li>G4: AD enzymes</li> <li>G5: AD extruded A.</li> <li>G6: AD hydrolysed A</li> </ul>

					G7: AD industrial-dried G8: AD vacuum-dried		
Choi et al., 2020	Korea	<i>Allomyrina dichotoma</i> larva	24 male rats Sprague Dawley 4 weeks old	20%	(n = 8/group)	28 days	↑ Food intake ↔ Body weight ↓ FER ↔ PER ↔ TD ↔ Liver kidney, spleen and lymph node weight ↔ ALT and AST
Tyshko et al., 2021	Russian	<i>Hermetia illucens</i> larva	28 male rats Wistar 25 - 50 days old	12%	(n=14/ group)	25 days	↔ Body weight ↓ NPU ↓ TD ↔ Biological Value ↔ PER, NPR ↑ Nitrogen excretion
Traksele et al., 2021	Lituânia	<i>Hermetia illucens</i> larva	27 male albino rats	10%	(n = 9/goup)	9 days	↔ Weight gain ↔ Feed intake, protein intake and nitrogen intake ↓ TD
Araujo et al. 2021	Brazil	<i>Gryllus assimilis</i>	40 male Fisher rats 21-23 days old	10%	(n=8/group)	14 days	↔ Food intake ↓ Weight gain ↓ TD ↓ NPR ↓ NPU ↔ Serum total protein, Albumin, ALT, AST, urea ↑ Creatinine ↓ Glucose

TM: *Tenebrio molitor*; AD: Acheta domesticus; ATL: Alanine aminotransferase; AST: Aspartate aminotransferase; HLM: housefly larvae meal; PER: Protein Efficiency Ratio; BV: biological value; NPR: Net protein ratio; NB: Nitrogen Balance; NPU: Net protein utilization; AAS: Amino Acid Score; PRE: Protein retention efficiency. TD: True digestibility; FER: Feed conversion ratio; TDP: true protein digestibility.

### 3.4 Protein quality

Data on daily food intake, animal weight gain, protein intake, and nitrogen excretion in feces and urine were used to measure the feeding efficiency of insects. The protein efficiency ratio (PER) is calculated by weight gain or loss in relation to protein intake and reflects the protein digestibility and amino acid bioavailability of a test protein. In two studies, the control protein had a higher PER, compared to the diets with the addition of insects<sup>[11, 17]</sup>. Ekpo (2011)<sup>[16]</sup> and Inje et al. (2018)<sup>[14]</sup> found similar results when evaluating the protein quality of 4 insects. In both studies, most evaluated insects presented reduced PER values, except for *Rhynchophorus phoenicis larvae* and *Gryllus assimilis*, in which the PER value found was higher than that of casein. The protein efficiency ratio did not differ from the casein-containing control diet in only one study<sup>[9]</sup>.

Net protein ratio (NPR) is determined taking into account the average weight gain of the animals in the test group, weight loss of the animals fed the non-protein diet and the average protein intake. In three studies, no NPR differences were observed between animals that consumed casein and animals in the test groups<sup>[12-14]</sup> Araujo et al., (2020)<sup>[15]</sup>, found lower NPR values for animals fed with insects.

Most studies included (n=7;70%) evaluated the true digestibility (TD) of insect proteins, an index that indicates how well a protein is digested. In two of them, TD did not differ from the casein-containing control diet<sup>[9, 13]</sup>. However, most studies (n=5; 50%) observed lower values for the test proteins<sup>[6, 11, 12, 14, 15]</sup>.

The biological value (BV) of proteins was investigated in three studies (n=3; 30%), two of which found no significant difference in BV, compared to the control group<sup>[12, 16]</sup>. One study observed higher biological value for Cricket, Moth, Grasshopper and Termite compared to casein<sup>[14]</sup>.

Net protein utilization (NPU) measures how well a protein is digested and used. Three studies included in this review evaluated this index<sup>[12, 14, 15]</sup>. Inje et al. (2018)<sup>[14]</sup>, observed that the NPU for insects was similar to that of the casein control group, however two studies found reduced NPU values for the control group<sup>[12, 15]</sup>.

### 3.5 Nitrogen: Intake and Excretion

Tyshko et al. (2021)<sup>[12]</sup>, observed increased nitrogen excretion in urine and feces in animals that were fed with larval biomass of *H. illucens* protein equivalent, although the same amount of nitrogen was ingested by both groups, regardless of the protein source. The study by Poelaert et al. (2018)<sup>[11]</sup>, also found lower nitrogen retention in animals fed *Acheta domesticus*

and *Tenebrio molitor* when compared to animals fed casein. In turn, Chagwena et al. (2019)<sup>[17]</sup>, found no difference in the excretion of nitrogen in the feces of the animals in the test and control groups, nor difference in nitrogen consumption between the groups.

### 3.6. Amino acid profiles, PDCAAS and DIAAS

Xia et al. (2012)<sup>[13]</sup>, investigated the amino acid profile of *Clanis bilineata* larvae meal and compared it with the amino acid profile of milk and eggs. It was verified that contents of the amino acids methionine, cysteine, tyrosine, and histidine of the larvae of *Clanis bilineata* were higher than those found in milk and eggs. Furthermore, the content of arginine, a conditionally essential amino acid, was comparable to that found in eggs, but higher than that of milk. In addition, the levels of essential and conditionally essential amino acids and the ratio between essential and total amino acids of CB larvae were higher than those found in eggs and milk.

Only one of the included studies performed amino acid score (AAS). Poelaert et al. (2018)<sup>[11]</sup>, observed lower AAS among the animals that received *Acheta domesticus* or *Tenebrio molitor*, compared to the animals that received casein.

Protein quality can be routinely assessed using the protein digestibility-corrected amino acid score (PDCAAS) value, obtained by multiplying the smallest AAS by the true protein digestibility measured in rats<sup>[18]</sup>. The study by Poelaert et al. (2018)<sup>[11]</sup>, demonstrated that the PDCAAS values of *Acheta domesticus* and *Tenebrio molitor* were 83.9% and 86.4%, respectively. On the other hand, Tracksale et al. (2021)<sup>[6]</sup>, found a lower percentage of PDCAAS (75.21%) in larvae of *Hermetia illucens* L.

According to Inje et al. (2018)<sup>[14]</sup>, the highest value of PDCAAS, 73%, was found for *Gryllus assimilis*, *Cirina forda*, *Melanoplus foedus* and *Macrotermes nigeriensis* presented PDCAAS values equal to 42%, 46%, and 42%, respectively.

Tyshko et al. (2021)<sup>[12]</sup>, carried out a study on the composition and calculation of digestible indispensable amino acid scores (DIAAS). It was observed that *H. illucens* protein presented a relatively high content of histidine, threonine, valine, isoleucine and leucine (DIAAS>100), besides being a source of sulfur amino acids - methionine and cysteine (DIAAS=86) and lysine (DIAAS=97). In turn, Traksele et al. (2021)<sup>[6]</sup>, found a percentage of 73% for DIAAS for larvae of *Hermetia illucens* L.

### 3.7 Processing effects

When comparing different forms of processing, Jensen et al. (2019)<sup>[10]</sup>, detected no differences in the final weight, ingestion, and excretion of nitrogen in urine and feces of animals fed with *Tenebrio molitor* and *Alphitobius diaperinus* between the different products developed.

Furthermore, the apparent and true digestibility revealed no differences between the experimental groups, and TD ranged from 91 to 94% in this study. The PDCAAS of lyophilized *Tenebrio molitor* was lower than that of *Alphitobius diaperinus* under the same treatment. Among the different treatments on *Alphitobius diaperinus*, the sample with industrial-dried treatment presented PDCAAS rates higher than that of the vacuum-dried sample.

In a study by Poelaert et al. (2018)<sup>[11]</sup>, the diets formulated with insects that underwent heat treatment obtained lower PER values when compared to insect diets without heat treatment. Furthermore, the heat treatment caused a greater reduction in PER in *Tenebrio molitor* diets than in the *Acheta domesticus* diet.

It was also observed that, when compared to each other, the unheated *Tenebrio molitor* provided better protein digestibility coefficients (APD and TPD) than the unheated *Acheta domesticus*. The protein digestibility and nitrogen retention of *Tenebrio molitor* were more affected by heat treatment than *Acheta domesticus*. Besides, the heat treatments applied caused greater reduction in the values of PDCAAS of *Tenebrio molitor*, compared to *Acheta domesticus*.

### 3.8. Other aspects: toxicity, general condition of the animals, and weight of the organs

Four studies evaluated the toxicity related to the consumption of insects as a protein source in the diet through the levels of alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST), which provide information about liver function. Choi et al. (2020)<sup>[9]</sup>, and Araujo et al. (2019)<sup>[15]</sup> evaluated the consumption of *Allomyrina dichotoma* larvae and *Gryllus assimilis*, respectively, and reported no significant differences in ALT and AST enzymes. This result indicate levels of hepatocellular function, concluding that there was no liver damage compared to the control group. On the other hand, Ekpo (2011)<sup>[15]</sup> and Inje et al. (2019)<sup>[16]</sup> found higher levels of these enzymes when they fed IB, termite and grasshopper to the animals.

Three studies evaluated qualitative characteristics regarding the general condition of the animals<sup>[10, 12, 16]</sup>. There were no differences in any of them related to the appearance, coat quality or behavior of the animals between the groups that received diet containing insects and standard

diet with casein. The animals appeared healthy, agile and did not exhibit any unexpected behavior.

Three studies evaluated the weight of the organs<sup>[9, 14, 16]</sup>. No differences were found in the weight of spleen, lymph nodes, heart or lung between the animals fed with proteins and those fed with insects. Liver weight differed in the study by Ekpo (2011)<sup>[16]</sup>, which directly correlated with feed intake in the test group.

### 3.9 Risk of bias

Out of the studies included in this systematic review (n=10), all baseline characteristics (gender, age, and initial weight of the animals) were cited in three studies (n=3, 37.5%). In none of the studies, the allocation of animals was described in detail. Only two studies mentioned whether the allocation of animals to treatment groups was performed randomly (n=2, 25%). In addition, none of the studies reported the blinding of the investigators involved in the research (Figure 2).

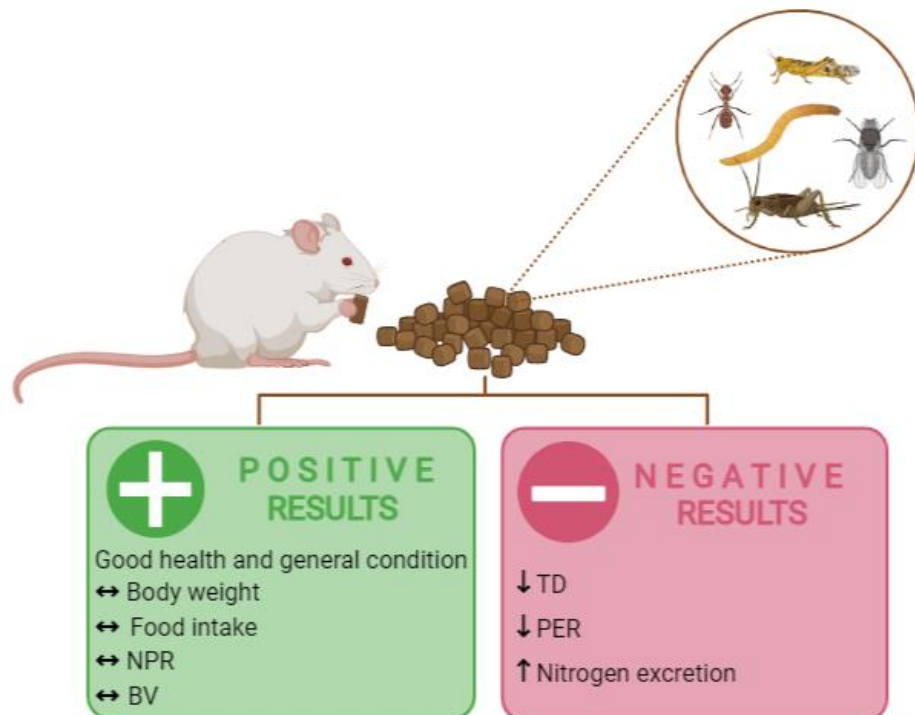
	Sequence generation	Baseline characteristics	Allocation concealment	Random housing	Blinding	Random outcome assessment	Blinding	Selective outcome reporting	Other sources of bias
Araújo et al., 2021	?	+	?	?	?	?	?	+	+
Chagwena et al., 2019	?	?	?	+	?	?	?	+	+
Choi et al., 2020	?	+	?	?	?	?	?	+	+
Ekpo, 2011	?	+	?	?	?	?	?	+	+
Inje et al., 2018	?	+	?	?	?	?	?	+	+
Jensen et al., 2019	?	?	?	?	?	?	?	+	-
Poelaert et al., 2018	+	?	?	+	?	?	?	+	+
Traksele et al., 2021	?	?	?	?	?	?	?	+	+
Valerievna et al., 2021	?	+	?	?	?	?	?	+	+
Xia et al., 2012	-	?	-	?	?	?	?	+	+

**Figure 2.** Risk of bias summary: review of authors' judgments about the risk of bias item for each included study. The items in the Systematic Review Centre for Laboratory Animal Experimentation (SYRCLE) risk of bias assessment were scored with "yes" indicating low risk of bias, "no" indicating high risk of bias, or "unclear" indicating that the item was not reported, which resulted in an unknown risk of bias. Green: low risk of bias; yellow: unclear risk of bias; red: high risk of bias.

### 3. Discussion

In view of the nutritional and physiological importance of proteins and their amino acids, there has been a growing interest in identifying alternative protein sources that meet the AAI of humans and animals<sup>[3]</sup>. Proteins are molecules essential for life, formed by smaller units joined by peptide bonds, the amino acids<sup>[19]</sup>. Amino acids are building blocks for tissue proteins and indispensable substrates for the synthesis of low molecular weight substances with great physiological importance<sup>[20]</sup>, usually classified as nutritionally “indispensable” or “dispensable”, according to the growth and/or nitrogen balance of animals<sup>[21]</sup>.

Edible insects are an alternative to the increased demand for proteins, since they can be low-carbon mass produced<sup>[4]</sup>. In order to gather available evidence on the quality and biological value of insect proteins, we reviewed *in vivo* studies that evaluated parameters related to their consumption. Thus, although heterogeneous, most studies that evaluated parameters such as body weight, food intake, NPR, and BV demonstrated that the consumption of either insect proteins or casein maintained these indices similarly. However, negative results related to lower TD, PER, and increased nitrogen excretion were observed when the protein source came from insects (Figure 2).



**Figure 3.** Impacts of using edible insects as a protein source in an animal model. NPR: Net Protein Utilization; BV: Biological Value; TD: True Digestibility; PER: Protein efficiency ratio.

The protein content found in the insects studied ranged from 22.06 to 75.5% in relation to their dry weight, which allows classifying them as promising sources of proteins, comparable

to products of animal origin, regarding the nutritional and biological value<sup>[12]</sup>. These variations can be attributed to several factors, including geographic and climatic conditions, the feeding regime of insects, their metamorphic age and even the application of different forms of processing, which are determinants of the nutrient content of edible insects<sup>[22]</sup>.

Insects are covered by an exoskeleton whose main component is chitin, a polysaccharide of N-acetylglucosamine<sup>[23]</sup>. Chitin is the second most abundant carbohydrate in nature, and there is no consensus whether humans can metabolize it<sup>[23]</sup>. However, the accessibility of digestive enzymes and the solubility of chitin are reduced<sup>[24]</sup>, due to this, negative effects of chitin on the digestibility of proteins in insects<sup>[25,26]</sup>.

In most of the insects studied, the value of PER was lower, compared to the control protein. Factors such as the age of the animals, duration of the experimental period, protein level and sex affect the PER assay<sup>[27]</sup>. Not all of the studies included in this review were not conducted under the ideal standardized conditions, such as a four-week experimental feeding period, diets containing 10% level of protein, with enough amounts of all other essential nutrients or the use of male rats. All of these factors are fundamental to produce reproducible results<sup>[27]</sup>.

The net protein ratio (NPR) takes into account the weight loss of rats fed a protein-free diet<sup>[28]</sup>. The findings of this study were positive as they demonstrate that most studies that evaluated NPR found no differences between casein-eating animals and the animals in the test groups. Therefore, a net protein ratio of the insects studied resembles casein, a reference protein as for this parameter.

The true digestibility of a protein is a reflection of the extent to which the amino acids in a protein source are digested, absorbed and available for biological processes, which is an important factor in the analysis of the quality of a nutritional protein. Despite the high protein contents presented in the insects included in this review, their lower digestibility values when compared to the casein feeding groups can be attributed to the presence of anti-nutritional factors, such as chitin, a material resistant to digestion that can protect the protein materials present in insects<sup>[14]</sup>.

However, although most studies observed lower digestibility values compared to the control groups, insects were still highly digestible when compared to vegetable proteins. Legume protein digestibility, for example, ranges from 64 to 77%. On the other hand, insect proteins are less digestible than conventional animal protein, such as eggs and meats<sup>[29, 30]</sup>.

The biological value of a protein provides a measure of how efficiently the body uses it. The high biological value of proteins of insects observed in the studies included in this review demonstrates that edible insects correlate with a high supply of essential amino acids<sup>[31]</sup>.

The dietary proteins provide amino acids for the synthesis of plasma proteins, which are necessary to maintain osmotic balance, transport substances through the blood and maintain immunity. They also play a significant role in the activities of enzymes and hormones in the body, which are growth promoters<sup>[14]</sup>. Low intake leads to limited growth<sup>[32]</sup>. Besides, there is evidence that dietary protein restriction negatively affects the skeletal development of young rats<sup>[33]</sup>.

Growth performance and body weight can provide essential information for evaluating the effect of including insects in the diet. Accordingly, we can highlight the results found in most of the included studies, which did not report differences in body weight between the animals in the control group (casein) and those in the intervention group, which received insects as a source of protein. It demonstrates that insects can be considered a good source of protein.

In contrast, Inje et al. (2018)<sup>[14]</sup> and Xia et al. (2012)<sup>[13]</sup> observed a greater weight gain in rats fed protein from crickets and *Clanis bilineata* larvae, respectively, compared to the control group. These findings can be explained by the greater amount of protein offered by insects and the likely differences in the proximate composition of insect meal when compared to the control group.

Nitrogen balance is defined as the difference between nitrogen intake and excretion and reflects the gain or loss of total body protein. Thus, nitrogen balance is a marker indicated to quantify the adequate protein intake<sup>[34]</sup>. Jensen et al. (2019)<sup>[10]</sup> and Xia et al. (2012)<sup>[13]</sup> observed no significant difference in nitrogen balance between the groups that received a casein diet and those that received an insect meal diet. Chagwena et al. (2019)<sup>[17]</sup>, did not observe differences in the consumption and excretion of nitrogen in the feces between the studied groups, which highlights the high biological value of insect meals, as well as their potential to replace conventional sources of protein<sup>[12, 13]</sup>.

Tyshko et al. (2021)<sup>[12]</sup>, observed higher nitrogen excretion in feces and urine in the test group when compared to the control group, which may be due to the presence of non-protein nitrogen in the chitin of the exoskeleton of the larvae. On the other hand, Finke (2007)<sup>[35]</sup>, observed a minimal amount of non-protein nitrogen content present in insects, which makes it impossible for them to interfere with nitrogen excretion.

It is common for edible insects to undergo some type of thermal processing before cooking, which can increase their quality, safety, flavor, and shelf life<sup>[26]</sup>. Poelaert et al. (2018)<sup>[11]</sup>, found lower nitrogen retention in animals fed diets composed of insects that underwent some thermal processing. This result can be explained by the interference of such processing in proteins, since they have the ability to denature and, consequently, reduce amino acids<sup>[36, 37]</sup>.

Due to sanitary issues, insects are rarely consumed in fresh form, but require heat treatments<sup>[1]</sup>. As reported in the studies by Jensen et al. (2019)<sup>[10]</sup> and Poelaert et al. (2018)<sup>[11]</sup>, heat treatments can affect protein quality, nutritional value and digestibility. This is due to the changes in the physicochemical and structural properties of proteins, as well as the destruction of amino acids sensitive to heat<sup>[38-40]</sup>.

Another important factor is the presence of the chitin exoskeleton, which, independent of its quantity and due to its hardness, resulting from the crosslinking of protein chains, increasingly inhibits the digestibility of the protein present in the insect. The exoskeleton chitin has nitrogen in its composition, which is incorrectly included in the crude protein estimation<sup>[35, 41]</sup>.

The PDCAAS method is also largely used to assess the quality of protein sources<sup>[18]</sup>. Thus, 5 articles included in this systematic review analyzed the content of amino acids present in edible insects used in *in vivo* studies. Xia et al. (2012)<sup>[13]</sup>, revealed that the contents of the amino acids methionine, cysteine, tyrosine and histidine of *Clanis bilineata* larvae were higher than those found in milk and eggs. Inje et al. (2018)<sup>[14]</sup>, Poelaert et al. (2018)<sup>[11]</sup> and Tracksale et al. (2021)<sup>[6]</sup> performed the PDCAAS analysis. PDCAAS of 73% were found in *Gryllus assimilis*<sup>[14]</sup>; PDCAAS of 83.9%, in *Acheta domesticus*; 86.4%, for *Tenebrio molitor*<sup>[11]</sup> and PDCAAS of 75.21%, in *Hermetia illucens L.* larvae<sup>[6]</sup>.

The DIAAS method, based on the ileal digestibility value of AA, is recommended by FAO to evaluate and classify foods for protein quality, which makes it more comprehensive<sup>[1]</sup>. Only two of the studies included in the present review evaluated the DIAAS method<sup>[6, 12]</sup>. Tyshko et al. (2021)<sup>[12]</sup>, demonstrated that the *H. illucens* protein is characterized by a relatively high content of histidine, threonine, valine, isoleucine and leucine (DIAAS>100); DIAAS=86 was reported for sulfur amino acids; and DIAAS=97, for lysine. On the other hand, Traksele et al. (2021)<sup>[6]</sup>, found a DIAAS value of 73 for the larvae of *Hermetia illucens L.*

According to the FAO/WHO recommendation, DIAAS values >100 characterize the content of a given amino acid as high; while DIAAS values in the range of 75-99% allow the

protein to be attributed as a "source" of a given amino acid. For comparison purposes, the average value of DIAAS > 100 is typical, for example, for the essential amino acids of pork meat and egg protein, and the value of DIAAS > 75, for soy proteins<sup>[12]</sup>.

Thus, a comparative analysis between the amino acid composition of the insects included in the studies of this review and traditional food products, including those related to complete protein sources, indicates a high biological value of the protein of the insects studied. Lower DIAAS values, which were observed in the study by Traksele et al. (2021)<sup>[6]</sup>, can be explained by the quality of the protein. High-quality proteins, such as casein, are almost completely digested and absorbed in the small intestine<sup>[42]</sup>. Therefore, they have high ileal digestibility.

The heterogeneity among the results found is the main limiting factor of this systematic review. Although most studies aim to evaluate the protein quality of edible insects *in vivo*, there is no standardization of indices for this evaluation, which complicates the comparison of the results. In addition, few studies have evaluated the protein quality of edible insects, which makes it difficult to group the results according to the same order or insect species. This increases the heterogeneity of the results and makes it difficult to synthesize and understand them.

Further experimental studies are needed to clarify the possible effects of insect consumption as a protein source and support the findings reported to date. Thus, further systematic reviews will be able to group, among insect species, parameters to evaluate the quality of proteins, amino acid content, as well as biometric data, food intake and growth, so as to broaden the understanding of their effects and beneficial potential, according to the species to which they belong.

#### **4. Conclusion**

Due to the high heterogeneity of the results of this systematic review, it cannot be concluded that the insects have high protein quality, although we observed the maintenance of indices such as body weight, food intake, and NPR in most studies that evaluated these parameters, when compared to a casein diet. On the other hand, greater excretions of nitrogen and lower TD were found in most studies that evaluated these parameters in relation to the consumption of insect meal as a protein source.

There are some challenges related to the characterization and evaluation of the quality of insect meals as a protein source, as well as an index standardization and a grouping that

facilitates the understanding of the potential of each insect species individually. The resolution of these obstacles will make it possible to carefully evaluate the introduction of these protein sources in the diet, the safety of their use, including possible allergies, and then possibly extrapolate the use of these flours for human consumption.

## 5. References

- [1] FAO. Dietary Protein Quality Evaluation in Human Nutrition. Report of an FAO Expert Consultation. *FAO Food Nutr. Pap.*, **2013**, *92*, 1–76.
- [2] Gómez, B.; Munekata, P. E. S.; Zhu, Z.; Barba, F. J.; Toldrá, F.; Putnik, P.; Bursac Kovačević, D.; Lorenzo, J. M. Challenges and Opportunities Regarding the Use of Alternative Protein Sources: Aquaculture and Insects. *Adv. Food Nutr. Res.*, **2019**, *89*, 259–295. <https://doi.org/10.1016/BS.AFNR.2019.03.003>.
- [3] Malla, N.; Nørgaard, J. V.; Lærke, H. N.; Heckmann, L. H. L.; Roos, N. Some Insect Species Are Good-Quality Protein Sources for Children and Adults: Digestible Indispensable Amino Acid Score (DIAAS) Determined in Growing Pigs. *J. Nutr.*, **2022**, *152* (4), 1042–1051. <https://doi.org/10.1093/jn/nxac019>.
- [4] Smetana, S.; Mathys, A.; Knoch, A.; Heinz, V. Meat Alternatives: Life Cycle Assessment of Most Known Meat Substitutes. *Int. J. Life Cycle Assess.*, **2015**, *20* (9), 1254–1267. <https://doi.org/10.1007/S11367-015-0931-6/TABLES/2>.
- [5] de Castro, R. J. S.; Ohara, A.; Aguilar, J. G. dos S.; Domingues, M. A. F. Nutritional, Functional and Biological Properties of Insect Proteins: Processes for Obtaining, Consumption and Future Challenges. *Trends Food Sci. Technol.*, **2018**, *76*, 82–89. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2018.04.006>.
- [6] Traksele, L.; Speiciene, V.; Smicius, R.; Alencikiene, G.; Salaseviciene, A.; Garmiene, G.; Zigmantaite, V.; Grigaleviciute, R.; Kucinskas, A. Investigation of in Vitro and in Vivo Digestibility of Black Soldier Fly (*Hermetia Illucens* L.) Larvae Protein. *J. Funct. Foods*, **2021**, *79*, 104402. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2021.104402>.
- [7] Page, M. J.; McKenzie, J. E.; Bossuyt, P. M.; Boutron, I.; Hoffmann, T. C.; Mulrow, C. D.; Shamseer, L.; Tetzlaff, J. M.; Akl, E. A.; Brennan, S. E.; et al. The PRISMA 2020 Statement: An Updated Guideline for Reporting Systematic Reviews. *Syst. Rev.*, **2021**, *10* (1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/S13643-021-01626-4/FIGURES/1>.
- [8] Hooijmans, C. R.; Rovers, M. M.; De Vries, R. B. M.; Leenaars, M.; Ritskes-Hoitinga, M.; Langendam, M. W. SYRCLE’s Risk of Bias Tool for Animal Studies. *BMC Med.*

- Res. Methodol.*, **2014**, *14* (1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2288-14-43>.
- [9] Choi, Y. J.; Fan, M.; Kim, E. K.; Lee, S. B.; Hwang, Y. H.; Jang, Y. H.; Bae, S. M. In Vivo Assessment of the Nutritional Value of *Allomyrina Dichotoma* Larva Protein as Future Protein Resource. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **2020**, *52* (6), 610–615. <https://doi.org/10.3839/10.9721/KJFST.2020.52.6.622>.
- [10] Jensen, L. D.; Miklos, R.; Dalsgaard, T. K.; Heckmann, L. H.; Nørgaard, J. V. Nutritional Evaluation of Common (*Tenebrio molitor*) and Lesser (*Alphitobius Diaperinus*) Mealworms in Rats and Processing Effect on the Lesser Mealworm. *J. Insects as Food Feed* , **2019**, *5* (4), 257–266. <https://doi.org/10.3920/JIFF2018.0048>.
- [11] Poelaert, C.; Francis, F.; Alabi, T.; Caparros Megido, R.; Crahay, B.; Bindelle, J.; Beckers, Y. Protein Value of Two Insects, Subjected to Various Heat Treatments, Using Growing Rats and the Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score. *J. Insects as Food Feed* , **2018**, *4* (2), 77–87. <https://doi.org/10.3920/JIFF2017.0003>.
- [12] Tyshko, N. V.; Zhminchenko, V. M.; Nikitin, N. S.; Trebukh, M. D.; Shestakova, S. I.; Pashorina, V. A.; Sadykova, E. O. The Comprehensive Studies of *Hermetia Illucens* Larvae Protein's Biological Value. *Probl. Nutr.*, **2021**, *90* (5), 49–58. <https://doi.org/10.33029/0042-8833-2021-90-5-49-58>.
- [13] Xia, Z.; Wu, S.; Pan, S.; Kim, J. M. Nutritional Evaluation of Protein from *Clanis Bilineata* (Lepidoptera), an Edible Insect. *J. Sci. Food Agric.*, **2012**, *92* (7), 1479–1482. <https://doi.org/10.1002/JSFA.4730>.
- [14] Inje O. F.; Akanya, H. O.; Jigam, A. A.; Saidu, A. N.; Egwim, E. C. Protein Quality of Four Indigenous Edible Insect Species in Nigeria. *Food Sci. Hum. Wellness*, **2018**, *7* (2), 175–183. <https://doi.org/10.1016/J.FSHW.2018.05.003>.
- [15] Araujo, R. R. S.; Fagundes, M. M. A.; Viana, A. M. F.; Paulino, A. H. S.; Silva, M. E.; Santos, E. M. Protein Quality Evaluation in Vivo of Cricket Flour (*Gryllus Assimilis*) Reared in Brazil. *J. Insects as Food Feed* , **2021**, *8* (4), 409–416. <https://doi.org/10.3920/JIFF2021.0096>.
- [16] Ekpo, K. E. Nutritional and Biochemical Evaluation of the Protein Quality of Four Popular Insects Consumed in Southern Nigeria. *Arch. Appl. Sci. Res.*, **2011**, *3* (6), 307–326.
- [17] Chagwena, D. T.; Matanhire, G.; Jombo, T. Z.; Maponga, C. C. PROTEIN QUALITY OF COMMONLY CONSUMED EDIBLE INSECTS IN ZIMBABWE. *African J. Food Agric. Nutr. Dev.*, **2019**, *19* (3), 14674–14689. <https://doi.org/10.18697/ajfand.86.17645>.

- [18] FAO. Protein Quality Evaluation. Report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation. *FAO Food Nutr. Pap.*, **1991**, 51.
- [19] Philippi, S. T.; Aquino, R. de C. Recomendações Nutricionais: Nos Estágios de Vida e Nas Doenças Crônicas Não Transmissíveis. **2017**.
- [20] Wu, G. Functional Amino Acids in Nutrition and Health. *Amino Acids*, **2013**, 45 (3), 407–411. <https://doi.org/10.1007/S00726-013-1500-6/TABLES/2>.
- [21] Wu, G. Amino Acids: Metabolism, Functions, and Nutrition. *Amin. Acids*, **2009**, 37 (1), 1–17. <https://doi.org/10.1007/S00726-009-0269-0>.
- [22] Meyer-Rochow, V. B.; Gahukar, R. T.; Ghosh, S.; Jung, C. Chemical Composition, Nutrient Quality and Acceptability of Edible Insects Are Affected by Species, Developmental Stage, Gender, Diet, and Processing Method. *Foods*, **2021**, 10 (5), 1036. <https://doi.org/10.3390/FOODS10051036>.
- [23] Van Huis, A., Rumpold, B., Maya, C., & Roos, N. Nutritional qualities and enhancement of edible insects. *Annu. Rev. Nutr.*, **2021**, 41, 551-576. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-041520-010856>
- [24] Bosch, G., Vervoort, J. J. M., & Hendriks, W. H. In vitro digestibility and fermentability of selected insects for dog foods. *Animal Feed Science and Technology*, **2016**, 221, 174-184. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.08.018>
- [25] Marono, S., Piccolo, G., Loponte, R., Di Meo, C., Attia, Y. A., Nizza, A., & Bovera, F. (2015). In vitro crude protein digestibility of *Tenebrio molitor* and *Hermetia illucens* insect meals and its correlation with chemical composition traits. *Italian journal of animal science*, **2015**, 14(3), 3889. <https://doi.org/10.4081/ijas.2015.3889>
- [26] Manditsera, F. A.; Luning, P. A.; Fogliano, V.; Lakemond, C. M. M. Effect of Domestic Cooking Methods on Protein Digestibility and Mineral Bioaccessibility of Wild Harvested Adult Edible Insects. *Food Res. Int.*, **2019**, 121, 404–411. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2019.03.052>.
- [27] Lamb, M. W.; Harden, M. L. Protein as a Source of Amino Acids. In *The Meaning of Human Nutrition*; Pergamon, 1973; pp 153–191. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-017079-4.50012-9>.
- [28] Manus, J.; Millette, M.; Dridi, C.; Salmieri, S.; Aguilar Uscanga, B. R.; Lacroix, M. Protein Quality of a Probiotic Beverage Enriched with Pea and Rice Protein. *J. Food Sci.*, **2021**, 86 (8), 3698–3706. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15838>.
- [29] Bhatta, N.; Gilani, A. H.; Nagra, S. A. Effect of Cooking and Supplementation on

- Nutritional Value of Gram (Cicer Arietinum). *Nutr. Res.*, **2000**, *20* (2), 297–307. [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(99\)00161-X](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(99)00161-X).
- [30] Schaafsma, G. The Protein Digestibility–Corrected Amino Acid Score. *J. Nutr.*, **2000**, *130* (7), 1865S–1867S. <https://doi.org/10.1093/JN/130.7.1865S>.
- [31] Hoffman, J. R.; Falvo, M. J. Protein - Which Is Best? . *J. Sports Sci. Med.*, **2004**, *3* (3), 118–130.
- [32] Braun, K. V. E.; Erler, N. S.; Kiefte-de Jong, J. C.; Jaddoe, V. W. V.; van den Hooven, E. H.; Franco, O. H.; Voortman, T. Dietary Intake of Protein in Early Childhood Is Associated with Growth Trajectories between 1 and 9 Years of Age. *J. Nutr.*, **2016**, *146* (11), 2361–2367. <https://doi.org/10.3945/JN.116.237164>.
- [33] Alippi, R. M.; Picasso, E.; Huygens, P.; Bozzini, C. E.; Bozzini, C. Growth-Dependent Effects of Dietary Protein Concentration and Quality on the Biomechanical Properties of the Diaphyseal Rat Femur. *Endocrinol. y Nutr.*, **2012**, *59* (1), 35–43. <https://doi.org/10.1016/J.ENDONU.2011.09.005>.
- [34] Dickerson, R. N. Nitrogen Balance and Protein Requirements for Critically Ill Older Patients. *Nutr.*, **2016**, *8* (4), 226. <https://doi.org/10.3390/NU8040226>.
- [35] Finke, M. D. Estimate of Chitin in Raw Whole Insects. *Zoo Biol.*, **2007**, *26* (2), 105–115. <https://doi.org/10.1002/ZOO.20123>.
- [36] Schlüter, O.; Rumpold, B.; Holzhauser, T.; Roth, A.; Vogel, R. F.; Quasigroch, W.; Vogel, S.; Heinz, V.; Jäger, H.; Bandick, N.; et al. Safety Aspects of the Production of Foods and Food Ingredients from Insects. *Molecular Nutrition and Food Research*. John Wiley & Sons, Ltd June 1, 2017, p 1600520. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600520>.
- [37] Churchward-Venne, T. A.; Pinckaers, P. J. M.; van Loon, J. J. A.; van Loon, L. J. C. Consideration of Insects as a Source of Dietary Protein for Human Consumption. *Nutr. Rev.*, **2017**, *75* (12), 1035–1045. <https://doi.org/10.1093/NUTRIT/NUX057>.
- [38] Sante-Lhoutellier, V.; Aubry, L.; Gatellier, P. Effect of Oxidation on In Vitro Digestibility of Skeletal Muscle Myofibrillar Proteins. *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, *55* (13), 5343–5348. <https://doi.org/10.1021/JF070252K>.
- [39] Bax, M. L.; Aubry, L.; Ferreira, C.; Daudin, J. D.; Gatellier, P.; Rémond, D.; Santé-Lhoutellier, V. Cooking Temperature Is a Key Determinant of in Vitro Meat Protein Digestion Rate: Investigation of Underlying Mechanisms. *J. Agric. Food Chem.*, **2012**, *60* (10), 2569–2576. <https://doi.org/10.1021/JF205280Y/ASSET/IMAGES/MEDIUM/JF-2011->

05280Y\_0002.GIF.

- [40] Salazar-Villanea, S.; Hendriks, W. H.; Bruininx, E. M. A. M.; Gruppen, H.; Van Der Poel, A. F. B. Protein Structural Changes during Processing of Vegetable Feed Ingredients Used in Swine Diets: Implications for Nutritional Value. *Nutr. Res. Rev.*, **2016**, 29 (1), 126–141. <https://doi.org/10.1017/S0954422416000056>.
- [41] Donoghue, S.; Langenberg, J. Clinical Nutrition of Exotic Pets. *Aust. Vet. J.*, **1994**, 71 (10), 337–341. <https://doi.org/10.1111/J.1751-0813.1994.TB00915.X>.
- [42] Chalupa-Krebzdak, S.; Long, C. J.; Bohrer, B. M. Nutrient Density and Nutritional Value of Milk and Plant-Based Milk Alternatives. *Int. Dairy J.*, **2018**, 87, 84–92. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2018.07.018>.

## Supplementary Materials

**Table S1:** Full search strategy in PubMed, Scopus, Web of Science and Embase.

Data base	Descriptors	Items Found	Time	Date
P u b  M e d	Edible Insects: #1  (("Insect" OR "Edible insect" OR "Insect, Edible" OR "Insects As Food" OR "As Food, Insects")	115513	8:41	08/05/22
	Protein Quality: #2  ("in vivo protein quality" OR "In vivo digestibility" OR "Digestibility" OR "Protein digestibility" OR "Protein quality" OR "True protein digestibility" OR "net protein retention" OR "NPR" OR "true digestibility" OR "nitrogen balance" OR "digestible indispensable amino acid score" OR "DIAAS" OR "Protein digestibility corrected amino acid score" OR "PDCAAS" OR "Feed Efficiency Ratio" OR "Protein Efficiency Ratio")	27484	8:50	08/05/22
	<b>Total: #1 and #2</b>	265	8:52	08/05/22
Data base	Descriptors	Items Found	Time	Date
S c o p u s	Edible Insects: #1  ("TITLE-ABS-KEY ( "Insect" ) OR TITLE-ABS- KEY ( "Edible insect" ) OR TITLE-ABS-KEY ( " Insect, Edible" ) OR TITLE-ABS-KEY ( "Insects As Food" ) OR TITLE-ABS-KEY ( "As Food, Insects" )	327382	9:13	08/05/22
	Protein Quality: #2  ( TITLE-ABS-KEY ( "in vivo protein quality" ) OR TITLE-ABS-KEY ( "In vivo digestibility" ) OR TITLE-ABS-KEY ( "Digestibility" ) OR TITLE- ABS-KEY ( "Protein digestibility" ) OR TITLE- ABS-KEY ( "Protein quality" ) OR TITLE-ABS- KEY ( "True protein digestibility" ) OR TITLE-	75571	9:17	08/05/22

	ABS-KEY ( "net protein retention" ) OR TITLE-ABS-KEY ( "NPR" ) OR TITLE-ABS-KEY ( "true digestibility" ) OR TITLE-ABS-KEY ( "nitrogen balance" ) OR TITLE-ABS-KEY ( "digestible indispensable amino acid score" ) OR TITLE-ABS-KEY ( "DIAAS" ) OR TITLE-ABS-KEY ( "Protein digestibility corrected amino acid score" ) OR TITLE-ABS-KEY ( "PDCAAS" ) OR TITLE-ABS-KEY ( "Feed Efficiency Ratio" ) OR TITLE-ABS-KEY ( "Protein Efficiency Ratio" ) )			
	<b>Total: #1 and #2</b>	723	9:20	08/05/22
<b>Data base</b>	<b>Descriptors</b>	<b>Items Found</b>	<b>Time</b>	<b>Date</b>
<b>W e b  O f f i c e n c e</b>	Edible Insects: #1  ("TS=("Insect" OR "Edible insect" OR "Insect, Edible" OR "Insects As Food" OR "As Food, Insects"))	158337	10:08	08/05/22
	Protein Quality: #2  TS=("in vivo protein quality" OR "In vivo digestibility" OR "Digestibility" OR "Protein digestibility" OR "Protein quality" OR "True protein digestibility" OR "net protein retention" OR "NPR" OR "true digestibility" OR "nitrogen balance" OR "digestible indispensable amino acid score" OR "DIAAS" OR "Protein digestibility corrected amino acid score" OR "PDCAAS" OR "Feed Efficiency Ratio" OR "Protein Efficiency Ratio")	75749	10:11	08/05/22
	<b>Total: #1 and #2</b>	570	10:15	08/05/22
<b>Data base</b>	<b>Descriptors</b>	<b>Items Found</b>	<b>Time</b>	<b>Date</b>

E M B A S E	Edible Insects: #1	423817	10:35	08/05/22
	("'edible insect'/exp OR 'insect-based food'/exp OR 'edible insects' OR 'insect burgers' OR 'insect foods' OR 'insect-based burgers' OR 'insect-based dishes' OR 'insect-based feed' OR 'insect-based feeds' OR 'insect-based feedstuffs' OR 'insect-based food' OR 'insect-based foods' OR 'insect-based foodstuff' OR 'insect-based foodstuffs' OR 'insect-based product (food)' OR 'insects as food' OR 'mealworm-based burgers' OR 'insect'/exp OR 'insecta' OR 'insect' OR 'insects'			
	Protein Quality: #2	14575	10:38	08/05/22
	'protein digestibility'/exp OR 'protein quality'/exp OR 'protein quality' OR 'protein digestion'/exp OR 'nitrogen balance'/exp OR 'balance, nitrogen' OR 'nitrogen balance' OR 'digestible indispensable amino acid score'/exp OR 'diaas' OR 'digestible iaa score' OR 'digestible indispensable aa score' OR 'digestible indispensable amino acid score' OR 'digestible indispensable amino acid score' OR 'true digestibility' OR 'true protein digestibility' OR 'net protein retention' OR 'protein digestibility corrected amino acid score'/exp OR 'pd-caas' OR 'pdcaas' OR 'protein digestibility corrected aa score' OR 'protein digestibility corrected amino acid (aa) score' OR 'protein digestibility corrected amino acid score' OR 'protein digestibility corrected amino acid scoring' OR 'protein digestible corrected amino acid score			
	<b>Total: #1 and #2</b>	192	10:41	08/05/22

## 6.2 ARTIGO 2:

### **Desenvolvimento, caracterização e propriedades da proteína de farinhas de *Tenebrio molitor* e *Gryllus assimilis* em diferentes estágios de desenvolvimento**

#### **RESUMO**

Diante das projeções de crescimento acelerado da população global, a entomofagia tem sido considerada uma alternativa promissora para suprir a prevista escassez de proteína convencional. Além de seu rico valor nutricional, os insetos possuem grande potencial como ingredientes para fins industriais, agregando boas propriedades tecnológicas, vantagens ambientais e econômicas. O objetivo deste estudo foi desenvolver e caracterizar farinhas de insetos comestíveis (*Tenebrio molitor* e *Gryllus assimilis*) com potencial de uso na alimentação humana em dois estágios de desenvolvimento. As farinhas de insetos foram analisadas quanto à sua composição centesimal, conteúdo de minerais, atividade antioxidante, compostos fenólicos, carotenoides, vitaminas C e E, riboflavina, niacina, perfil de aminoácidos, digestibilidade proteica *in vitro* e solubilidade em função do pH. As farinhas de *Tenebrio molitor* e *Gryllus assimilis* mostraram-se excelentes fontes de proteínas, fósforo, cobre, ferro, zinco, manganês, boas fontes de magnésio e fonte de potássio e niacina. As proteínas apresentaram boa digestibilidade e maior solubilidade em pH alcalino. As farinhas desenvolvidas atenderam às exigências de histidina, treonina, aminoácidos sulfurados e aminoácidos aromáticos, entretanto, a lisina foi o aminoácido limitante para ambas as espécies analisadas. O estágio de desenvolvimento dos insetos foi capaz de influenciar seu conteúdo nutricional, perfil de aminoácidos e propriedades funcionais da proteína, sendo que o *Gryllus assimilis* adulto e a pupa de *Tenebrio molitor* se destacaram em relação as ninfas e larvas das respectivas espécies. Sendo assim, farinhas desenvolvidas a partir de insetos possuem grande potencial como ingredientes para fins industriais, agregando valor nutricional e boas propriedades tecnológicas aos produtos.

**Palavras chave:** Entomofagia; insetos comestíveis; digestibilidade proteica; aminoácidos; compostos bioativos.

## 1. INTRODUÇÃO

As projeções de crescimento populacional apontam que a população mundial atingirá um total de 9,8 bilhões de pessoas em 2050 (ONU, 2017). Estima-se ainda que, para fornecer alimentos suficientes para toda essa população, a produção atual de alimentos precisará quase dobrar. Além da escassez de alimentos, temas como a degradação das terras agrícolas, infertilidade do solo, explosão de doenças, crise energética, aumento dos preços dos alimentos e disparidade de recursos também têm se tornado pauta na discussão sobre segurança alimentar e nutricional (NASEEM et al., 2021).

Nesse sentido, é evidente a necessidade da busca por formas alternativas e sustentáveis de produção de alimentos. A entomofagia, termo dado à prática do uso de insetos na alimentação, foi citado pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação como um caminho para combater questões de insegurança alimentar (FAO, 2009).

Os insetos apresentam composição nutricional relevante em relação à concentração de macro e micronutrientes, destacando-se seu elevado conteúdo de proteínas seguido de lipídeo, fibra alimentar e cinzas (RUMPOLD; SCHLÜTER, 2013; KOOH et al., 2019). Além disso, são considerados boas fontes de aminoácidos indispensáveis e indispensáveis (INJE et al., 2018). Entretanto, variações na composição nutricional dos insetos sofrem influência de acordo com sua espécie, método de processamento, tecnologia de criação, alimentação e estágio de desenvolvimento (MEYER-ROCHOW et al., 2021).

O *Tenebrio molitor* e *Gryllus assimilis* são dois insetos considerados alternativas promissoras para suprir a prevista deficiência de proteína convencional. Devido ao notável conteúdo proteico, lipídico e mineral, esses insetos possuem grande potencial como futuros ingredientes para fins industriais, agregando boas propriedades tecnológicas, vantagens ambientais e econômicas (MACHADO; THYS, 2019; GKINALI et al., 2022;).

Diante desse cenário, o objetivo deste estudo foi desenvolver e caracterizar farinhas de insetos comestíveis com potencial de uso na alimentação humana (*Tenebrio molitor* e *Gryllus assimilis*) em dois estágios de desenvolvimento.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

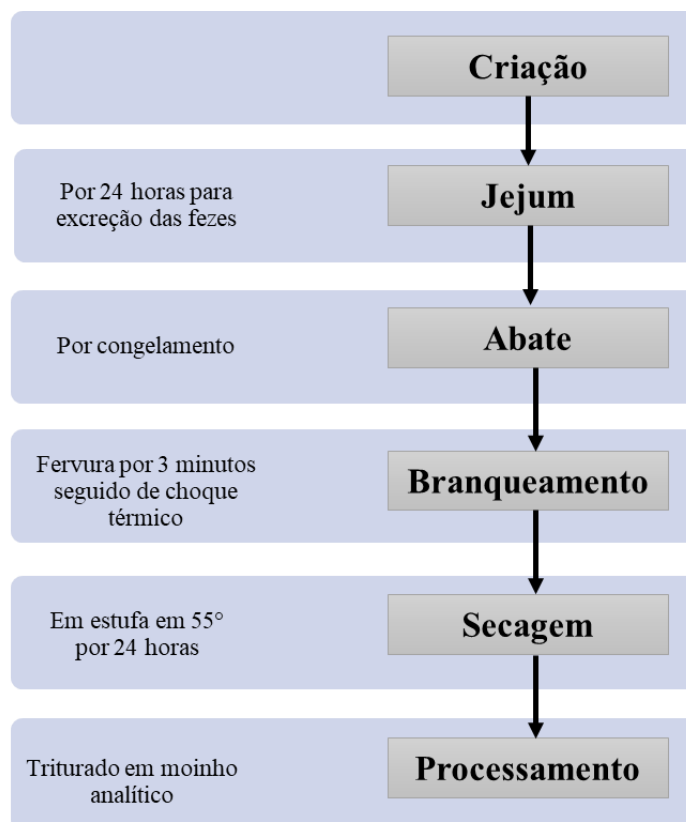
### 2.1 Insetos

Os grilos (*Gryllus assimilis*) e larva-da-farinha (*Tenebrio molitor*) utilizados foram adquiridos em 2021, da empresa *Ecological Food*, localizada na cidade de Limeira, São Paulo. Para analisar a influência da idade dos insetos em sua composição, dois estágios de

desenvolvimento de cada um dos insetos foram utilizados. Assim, para *Gryllus assimilis*, foram utilizados ninfa (GN) e adulto (GA) e, para o *Tenebrio molitor*, a larva (TL) e a pupa (TP).

## 2.2 Produção da farinha

O abate e processamento dos insetos foi realizado conforme protocolo realizado pela indústria de alimentos (FRAQUEZA; COUTINHO PATARATA, 2017). Dessa forma, os insetos foram submetidos a jejum de 24 horas para redução do conteúdo intestinal, devido à impossibilidade de retirar os excrementos manualmente. O abate foi realizado por redução de temperatura (congelamento a  $-18^{\circ}\text{C}$  por 24 horas). Posteriormente, os insetos passaram pelo processo de branqueamento para reduzir a contagem microbiana e inativar enzimas degradativas responsáveis pela deterioração dos alimentos (MELGAR-LALANNE et al., 2019). Nesse processo, os insetos foram submergidos em água fervente por 3 minutos e, em seguida foram submetidos a choque térmico em água resfriada por um minuto e drenados com o auxílio de peneira (VANDEWEYER et al., 2017). Subsequentemente foram desidratados em estufa de circulação de ar a  $55^{\circ}\text{C}$  por 24 horas e, em seguida, foram triturados em moinho analítico até a obtenção de uma farinha de fina granulação (Figura 1). As farinhas foram armazenadas em freezer ( $-18^{\circ}\text{C}$ ) até o momento das análises.



**Figura 1.** Fluxograma de obtenção das farinhas de insetos.

### 2.3 Análise da composição centesimal

Para determinar a composição centesimal em base seca, as amostras de farinhas de insetos foram analisadas quanto ao teor de umidade. Assim, 5 g das farinhas de insetos foram colocadas em placas de Petri previamente secas. O teor de umidade foi determinado pelo método de secagem em estufa (105 °C por 24 h) (AOAC, 2012). O conteúdo de proteína bruta foi determinado pelo método de ensaio *Kjeldahl* e expresso como g/100 g (base de peso seco). O conteúdo de lipídios totais foi determinado usando a extração *Soxhlet* de acordo com o método 920.39 (AOAC, 2011) e expresso em g/100 g (base de peso seco). O conteúdo de cinzas foi obtido pela incineração das amostras em um forno mufla a 550 °C por 24 h de acordo com o método 942.05 (AOAC, 2012) e expresso em g/100 g (base de peso seco). Os carboidratos foram estimados por diferença, levando em consideração os conteúdos de umidade lipídeos, proteína e cinzas. O valor calórico total das farinhas foi estimado considerando os fatores de conversão de 4 kcal/g para proteínas e carboidratos e 9 kcal/g para lipídios (BUCHHOLZ e SCHOELLER, 2004). Todas as análises são relatadas como valores médios ( $\pm$  desvio padrão) de três repetições.

### 2.4 Conteúdo de minerais

A digestão nitroperclórica dos elementos químicos seguiu a metodologia proposta por Sarruge & Haag (1974). A determinação dos elementos químicos foi realizada por espectrometria de emissão atômica em plasma indutivamente acoplado (ICP-AES) (Perkin Elmer, Optima 8300). Os resultados foram expressos em mg/100g em base seca.

### 2.4 Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante

Para preparo dos extratos, as farinhas de insetos foram pesadas e adicionadas de solução de extração composta de acetona:água (70:30, v/v), e submetidas à agitação em banho metabólico (DUBNOFF modelo MA-093) (180 rpm) em temperatura ambiente por 2 horas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (Multi-purpose centrifuge, NF 1200/1200R, 14000 rpm) por 15 minutos. As frações do sobrenadante foram filtradas em papel de filtro e os volumes completados para 20 mL. Os extratos foram armazenados em frascos âmbar e armazenados em freezer a -18 °C. Alíquotas dos extratos foram utilizadas na determinação da capacidade antioxidante e estimativa do conteúdo de fenólicos totais.

A determinação do conteúdo de compostos fenólicos nas amostras foi realizada em triplicata utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, conforme descrito por Singleton et al. (1999). A absorbância foi lida em espectrofotômetro (Thermo Scientific, Evolution 60S, EUA) a 765 nm. A concentração de compostos fenólicos totais foi expressa em mg GAE/g.

A capacidade antioxidante das farinhas desenvolvidas foi determinada utilizando o método do radical DPPH (2,2-difenil-2-picril-hidrazil) (Bloor, 2001). A absorbância foi lida em espectrofotômetro (Thermo Scientific, Evolution 60S, EUA) a 517 nm. A capacidade antioxidante foi expressa em mmol de equivalente de trolox/g de amostra (mmol trolox/g) (Bloor, 2001).

### 2.5 Percentual de contribuição

O potencial de contribuição das farinhas de insetos para o suprimento das recomendações diárias de proteínas, carboidratos, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, cobre, ferro, zinco, manganês, sódio, cromo, vitamina C, vitamina E e niacina foi estimado com base nas *Recommended Dietary Allowance* (RDA), para mulheres e homens adultos com idade entre 19 e 30 anos (IOM, 2001; IOM, 2005; IOM, 2011). Para os cálculos, uma porção de 50 g foi estipulada de acordo com a resolução RDC nº 359, de 23 de dezembro de 2003, que determina o tamanho de porções de farinhas e outros alimentos.

### 2.6 Vitaminas

As condições utilizadas para extração e análise do ácido ascórbico (vitamina C) foram as otimizadas por Campos et al. (2009). A ocorrência e concentração de carotenoides foram investigadas segundo método de extração proposto por Rodriguez-Amaya (2001) e analisados segundo Pinheiro-Sant'Ana (1998). As análises das vitaminas C e carotenoides foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por arranjo de diodos (DAD).

A extração de tocoferol ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ) e tocotrienol ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ) das amostras de insetos foi realizada de acordo com Pinheiro-Sant'Ana (2011) e de riboflavina e niacina, de acordo com Pinheiro-Sant'Ana (1999) com modificações. Posteriormente a extração, o conteúdo dessas vitaminas foi analisado por CLAE por detecção de fluorescência. A ocorrência e concentração das vitaminas foram expressas em mg do composto por 100g de amostra.

### 2.7 Aminoácidos

O perfil de aminoácidos foi determinado de acordo com os métodos AOAC (2000) e Liu et al. (1995). Os dados foram expressos em g de aminoácido por 100 g de amostra. O escore de aminoácidos para cada aminoácido indispensável foi calculado com base no padrão sugerido de requisitos de aminoácidos pela FAO para adultos (FAO, 2011).

O escore químico de aminoácidos foi calculado usando a fórmula:

$$\text{Escore de aminoácidos} = \frac{\text{mg aminoácido em 1 g de proteína no alimento}}{\text{mg de aminoácido em 1 g de proteína de referência}}$$

## 2.8 Digestibilidade proteica *in vitro*

O método de queda de pH foi utilizado para avaliação da digestibilidade proteica *in vitro* (MENDES et al., 2016). Uma solução enzimática contendo as enzimas tripsina bovina (Sigma-Aldrich, CAS nr. 9001-75-6, 3200-4500 units/mg protein) (2,5 mg/mL) e pancreatina suína (Sigma-Aldrich CAS nr. 8049-47-6) (1,6 mg/mL) foi utilizada para promover a hidrólise das proteínas.

Um volume de 50 mL de suspensão proteica foi preparado em água destilada (6,25 mg de proteína/mL), ajustado para pH 8 com uma solução de NaOH e submetido à agitação e controle de temperatura (37°C). Uma alíquota de 5 mL da solução enzimática foi adicionada à suspensão proteica e mantida a 37°C em banho-maria. A diminuição do pH foi aferida após 10 minutos usando um pHmetro digital. O cálculo de digestibilidade foi realizado de acordo com equação proposta por Mendes et al. (2016).

## 2.9 Grau de hidrólise

Para a determinação do grau de hidrólise (GH), foi realizada a comparação da proteína digerida enzimaticamente (tópico 2.8) com uma amostra completamente hidrolisada quimicamente. Um miligrama de proteína da farinha de inseto foi acrescentado a 1 mL de ácido sulfúrico 2 N e colocado em banho-maria fervente por 4 horas.

A amostra digerida quimicamente foi adicionada de 1 mL de água destilada (96° C), sonificada por 10 minutos, adicionada de 5 ug de ácido tricloroacético (TCA) e centrifugado por 30 min a 4°C e 20.000 rpm. O sobrenadante foi extraído e diluído a 1:20 para plaqueamento.

Posteriormente, a concentração de proteína de ambas amostras (pos-digestão química e enzimática) foi determinada por Bradford Protein Assay (BPA) (BRADFORD, 1976) usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

O grau de hidrólise foi calculado pela seguinte equação:

$$\text{Grau de hidrólise} = \frac{\text{Concentração de proteína após digestão enzimática}}{\text{Concentração de proteína após digestão química}} \times 100$$

## 2.10 Solubilidade proteica em função do pH

A solubilidade da proteína em função do pH foi determinada como descrito anteriormente com algumas modificações (MISHYNA et al., 2019). As amostras (0,2 g) foram dispersas em água destilada (10 mL) e o pH foi ajustado em 3, 5, 7, 9 e 11, por meio da adição de NaOH 1 M ou HCl 1 M. A dispersão foi agitada em um agitador magnético por uma hora a 40°C. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 3000 g por 20 min, os sobrenadantes

foram coletados para medição da concentração de proteína usando o método de Bradford (BRADFORD, 1976). A solubilidade da proteína foi calculada como uma razão entre a proteína solúvel no sobrenadante e o conteúdo total de proteína no tipo de farinha correspondente. A solubilidade da proteína [%] é apresentada em relação ao conteúdo de proteína total analisado pelo método de Kjeldahl.

A solubilidade proteica calculada pela seguinte equação:

$$\text{Solubilidade (\%)} = \frac{\text{Concentração de proteína no sobrenadante}}{\text{Concentração de proteína da amostra}} \times 100$$

### 2.11 Determinação do perfil das proteínas

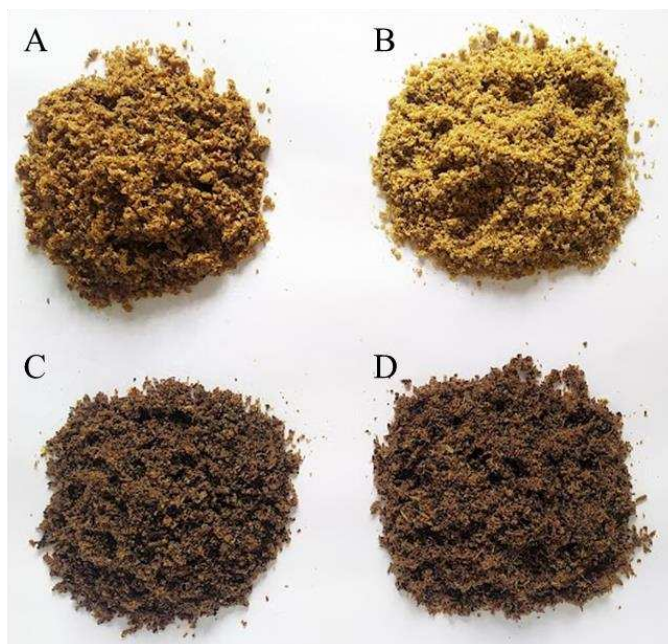
A distribuição do peso molecular das proteínas foi determinada por eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE). As amostras foram dissolvidas em tampão Tris 0,1 M, adicionadas de 0,5% de SDS a 10%, agitadas em vórtex e incubadas durante cinco minutos a 90°C. As amostras foram executadas com 12% (Tris-Glicina) gel com um marcador padrão na faixa de 10–250 kD (Biorad). A intensidade da banda das amostras foi estimada após a coloração dos géis com *Coomassie Brilliant blue*.

### 2.12 Análises estatísticas

Todos os dados foram analisados estatisticamente usando o software IBM SPSS 22.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, EUA). Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância unidirecional (ANOVA) determinando diferenças significativas entre as médias pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Para a comparação intra espécie de acordo com o estágio de desenvolvimento, foi conduzido o teste t de Student para amostras independentes. A variabilidade média dos dados foi indicada pelo desvio padrão.

## 3. RESULTADOS

Após a secagem e processamento dos insetos, as farinhas de *Tenebrio molitor* e *Gryllus assimilis* apresentaram coloração amendoada e castanho escuro, respectivamente (Figura 2). Ambas as espécies produziram farinhas com boa aparência e fina granulação, características que permitem sua incorporação como ingrediente em diversos produtos e preparações.



**Figura 2.** Farinhas de *Gryllus assimilis* e *Tenebrio molitor* em dois estágios de desenvolvimento. A: Farinha de pupa de *Tenebrio molitor* (TP); B: Farinha de larva de *Tenebrio molitor* (TL); C: Farinha de ninfa de *Gryllus assimilis* (GN); D: Farinha de *Gryllus assimilis* adulto (GA).

Foi observado elevado conteúdo de proteína nas farinhas de inseto desenvolvidas, variando entre 57,36 a 67,97% de sua composição total, seguido de seu conteúdo de lipídios, carboidratos e cinzas (Tabela 1). As farinhas desenvolvidas a partir de *Gryllus assimilis* apresentaram conteúdo mais elevado de cinzas (4,63% para GN e 4,88% para GA) e proteínas (67,97% para GN e 67,39% para GA), enquanto que o conteúdo de lipídios (32,46% para TL e 31,21% para TP) e o valor calórico total (546,80kcal para TL e 541,50kcal para TP) foram significativamente maiores nas farinhas obtidas do *Tenebrio molitor* (Tabela 1). O conteúdo de carboidratos não apresentou diferenças significativas entre as diferentes farinhas.

Em relação aos estágios de desenvolvimento, as farinhas de *Tenebrio molitor* difeririam entre si apenas no conteúdo de cinzas, sendo esse conteúdo mais elevado na farinha desenvolvida a partir de sua larva (TL). As farinhas de grilos diferenciam-se apenas quanto ao conteúdo de umidade, sendo que a farinha desenvolvida a partir do grilo adulto (GA) apresentou maior umidade. O conteúdo de macronutrientes foi semelhante entre as espécies independentemente de seu estágio de desenvolvimento (Tabela 1).

**Tabela 1.** Composição centesimal de farinhas de *Gryllus assimilis* e *Tenebrio molitor* em dois estágios de desenvolvimento

Espécie	Estágio de desenvolvimento	Composição centesimal (%)					VET (Kcal)
		Umidade	Lipídios	Cinzas	Proteínas	Carboidratos	
<i>Gryllus assimilis</i>	Ninfa (GN)	3,45±0,12 <sup>c</sup>	22,15±0,63 <sup>b</sup>	4,63±0,48 <sup>a</sup>	67,97±1,62 <sup>a</sup>	5,23±0,66 <sup>a</sup>	492,21±2,79 <sup>b</sup>
	Adulto (GA)	5,48±0,08 <sup>a*</sup>	23,23±0,90 <sup>b</sup>	4,88±0,03 <sup>a</sup>	67,39±5,35 <sup>a</sup>	4,48±1,23 <sup>a</sup>	496,61±4,63 <sup>b</sup>
<i>Tenebrio molitor</i>	Larva (TL)	4,96±0,35 <sup>a</sup>	32,46±0,31 <sup>a</sup>	3,88±0,06 <sup>b*</sup>	57,36±3,82 <sup>b</sup>	6,28±3,49 <sup>a</sup>	546,80±1,43 <sup>a</sup>
	Pupa (TP)	4,33±0,23 <sup>b</sup>	31,21±1,05 <sup>a</sup>	3,63±0,06 <sup>b</sup>	57,78±1,29 <sup>b</sup>	7,37±2,28 <sup>a</sup>	541,50±5,13 <sup>a</sup>

Valores expressos em base seca como média de triplicatas ± desvio padrão. Médias nas colunas seguidas por diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste ANOVA seguido de posthoc Tukey ( $p < 0,05$ ). \*Representa a diferença intra espécie em relação aos diferentes estágios de desenvolvimento avaliado pelo Teste t-Student. GA: Farinha de *Gryllus assimilis* adulto; GN: Farinha de ninfa de *Gryllus assimilis*; TL: Farinha de larva de *Tenebrio molitor*; TP: Farinha de pupa de *Tenebrio molitor*; VET: valor energético total em 100g das farinhas.

### 3.2 Conteúdo de minerais

Fósforo, potássio e sódio foram os elementos mais prevalentes nas farinhas de ambos os insetos (Tabela 2). Elevadas concentrações de cálcio e magnésio também foram observadas. Conteúdo maior ( $p > 0,05$ ) de fósforo, potássio, cálcio, manganês, cobre e sódio e cromófoi averiguado em GA em relação às outras amostras.

Quanto às diferenças intra espécie, as farinhas desenvolvidas com *Tenebrio molitor* diferiram na concentração de ferro (5,41±0,42 mg/100g vs. 6,37±0,21 mg/100g), magnésio (180±9 mg/100g vs. 164±12 mg/100g) e cromo (9±1,23 mg/100g vs. 19,6± 1,01 mg/100g), sendo que as pupas apresentaram maior conteúdo de ferro e cromo e as larvas maior conteúdo de magnésio. Maiores diferenças foram encontradas nas farinhas de *Gryllus assimilis*, visto que o grilo adulto apresentou maiores concentrações de fósforo, potássio, cálcio, magnésio, cobre, manganês, sódio e cromo quando comparado com a ninfa da mesma espécie (Tabela 2).

**Tabela 2.** Composição dos elementos químicos de farinhas de *Gryllus assimilis* e *Tenebrio molitor* em dois estágios de desenvolvimento

Elementos químicos	<i>Gryllus assimilis</i>		<i>Tenebrio molitor</i>	
	Ninfa (GN)	Adulto (GA)	Larva (TL)	Pupa (TP)
Fósforo (mg/100g)	617±21 <sup>b</sup>	732±19 <sup>a*</sup>	512±32 <sup>c</sup>	532±29 <sup>c</sup>
Potássio (mg/100g)	780±19 <sup>b</sup>	820±22 <sup>a*</sup>	663±28 <sup>c</sup>	624±23 <sup>c</sup>
Cálcio (mg/100g)	149±11 <sup>b</sup>	221±17 <sup>a*</sup>	56±3 <sup>c</sup>	50±3 <sup>c</sup>
Magnésio (mg/100g)	84±6 <sup>d</sup>	131±4 <sup>c*</sup>	180±9 <sup>a*</sup>	164±12 <sup>b</sup>
Cobre (mg/100g)	2,50±0,20 <sup>b</sup>	3,01±0,23 <sup>a*</sup>	1,45±0,09 <sup>c</sup>	1,63±0,11 <sup>c</sup>
Ferro (mg/100g)	8,23±0,21 <sup>a</sup>	8,41±0,14 <sup>a</sup>	5,41±0,42 <sup>c</sup>	6,37±0,21 <sup>b*</sup>
Zinco (mg/100g)	25,57±0,43 <sup>a</sup>	22,07±0,22 <sup>a</sup>	11,62±1,23 <sup>b</sup>	12,88±1,08 <sup>b</sup>
Manganês (mg/100g)	5,61±1,02 <sup>b</sup>	8,08±0,89 <sup>a*</sup>	1,64±0,04 <sup>c</sup>	1,63±0,03 <sup>c</sup>
Sódio (mg/100g)	279±9,64 <sup>b</sup>	340±11,09 <sup>a*</sup>	124±9,56 <sup>c</sup>	116±11,07 <sup>c</sup>
Cromo (µmg/100g)	1,5±0,12 <sup>d</sup>	37±3,31 <sup>a*</sup>	9±1,23 <sup>c</sup>	19,6± 1,01 <sup>b*</sup>
Molibdênio (mg/100g)	nd	nd	Nd	nd

Médias nas linhas seguidas por diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste ANOVA seguido de posthoc Tukey ( $p < 0,05$ ). \*Representa a diferença intra espécie em relação aos diferentes estágios de desenvolvimento avaliado pelo Teste t-Student. tr: traços; nd: não detectado.

### 3.3 Atividade antioxidante, conteúdo de compostos fenólicos totais e vitaminas

As farinhas de *Tenebrio molitor* apresentaram maiores concentrações de vitamina C, vitamina E e niacina em relação às farinhas de *Gryllus assimilis* (Tabela 3). Ainda, TP apresentou concentração mais elevada de compostos fenólicos totais e maior capacidade antioxidante tanto na comparação com as farinhas de *Gryllus assimilis* quanto comparação intra espécie. Não foram detectadas a presença de carotenoides e riboflavina nas farinhas desenvolvidas (Tabela 3).

**Tabela 3.** Ocorrência e concentração de vitamina C, vitamina E, carotenoides, riboflavina, niacina, compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante de farinhas de *Gryllus assimilis* e *Tenebrio molitor* em dois estágios de desenvolvimento.

Compostos	<i>Gryllus assimilis</i>		<i>Tenebrio molitor</i>	
	Ninfa (GN)	Ninfa (GN)	Larva (TL)	Pupa (TP)
Vitamina C (mg /100 g)	0,89±0,54 <sup>b</sup>	0,94±0,23 <sup>b</sup>	1,53±0,31 <sup>a</sup>	1,71±0,25 <sup>a</sup>
Vitamina E (mg /100 g)	1,02 ±0,27 <sup>b</sup>	0,98±0,18 <sup>b</sup>	2,01±0,14 <sup>a</sup>	2,16±0,11 <sup>a</sup>
Carotenoides (mg/100 g)	nd	Nd	nd	nd
Riboflavina (B <sub>2</sub> ) (mg/100 g)	nd	Nd	nd	nd
Niacina (B <sub>3</sub> ) (mg/100 g)	1,88±0,13 <sup>b</sup>	1,92±0,14 <sup>b</sup>	3,21±0,29 <sup>a</sup>	3,07±0,54 <sup>a</sup>
Fenólicos Totais (mg GAE/g)	1,641±0,02 <sup>bc</sup>	1,66±0,02 <sup>b</sup>	1,60±0,00 <sup>c</sup>	1,74±0,02 <sup>a*</sup>
Capacidade Antioxidante (mmol trolox/ g)	2,17±0,29 <sup>b</sup>	2,49±0,19 <sup>b</sup>	2,52±0,13 <sup>b</sup>	3,97±0,18 <sup>a*</sup>

Média ± desvio padrão de triplicata. Médias nas linhas seguidas por diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste ANOVA seguido de posthoc Tukey (p < 0,05). \*Representa a diferença intra espécie em relação aos diferentes estágios de desenvolvimento avaliado pelo Teste t-Student. GA: Farinha de *Gryllus assimilis* adulto; GN: Farinha de ninfa de *Gryllus assimilis*; TL: Farinha de larva de *Tenebrio molitor*; TP: Farinha de pupa de *Tenebrio molitor*; nd: não detectado.

### 3.4 Percentual de contribuição

Os alimentos podem ser classificados como "fontes" de algum nutriente quando fornecem de 5 a 10% das *Dietary Reference Intake* (DRI), como "boas fontes" quando suprem de 10 a 20% da DRI e como "excelentes fontes", quando atendem mais de 20% da DRI (Philippi, 2008).

Todas as farinhas desenvolvidas e analisadas podem ser classificadas como excelentes fontes de proteína, fósforo, cobre, ferro, zinco, manganês, como boas fontes de magnésio e como fonte de potássio e niacina (Tabela 4). Além disso, as farinhas de *Tenebrio molitor* são fontes de vitamina E e, as do *Gryllus assimilis*, boas fontes de magnésio e fontes de cálcio.

**Tabela 4.** Potencial de contribuição das farinhas de *Gryllus assimilis* e *Tenebrio molitor* em dois estágios de desenvolvimento para o suprimento das recomendações diárias de nutrientes para mulheres e homens na faixa etária de 19 a 59 anos, em uma porção estipulada de 50g.

Nutrientes	<i>Gryllus assimilis</i>				<i>Tenebrio molitor</i>			
	Ninfa (GN)		Ninfa (GN)		Larva (TL)		Pupa (TP)	
	% de contribuição <sup>a</sup>		% de contribuição <sup>a</sup>		% de contribuição <sup>a</sup>		% de contribuição <sup>a</sup>	
	Homens	Mulheres	Homens	Mulheres	Homens	Mulheres	Homens	Mulheres
<b>Carboidrato</b>	2,01	2,01	1,72	1,72	2,42	2,42	2,83	2,83
<b>Proteínas</b>	60,69	73,88	60,17	73,25	51,21	62,35	51,59	62,80
<b>Fósforo</b>	53,19	53,19	63,10	63,10	44,14	44,14	45,86	45,86
<b>Potássio</b>	8,30	8,30	8,72	8,72	7,05	7,05	6,64	6,64
<b>Cálcio</b>	7,45	7,45	11,05	11,05	2,80	2,80	2,50	2,50
<b>Magnésio</b>	10,50	13,55	16,38	21,13	22,50	29,03	20,50	26,45
<b>Cobre</b>	139,17	139,17	167,39	167,39	80,53	80,53	90,36	90,36
<b>Ferro</b>	51,44	22,86*	52,56	23,36*	33,81	15,03*	39,81	17,69*
<b>Zinco</b>	116,22	159,80	100,33	137,96	52,82	72,63	58,54	80,49
<b>Manganês</b>	122,07	155,97	175,70	224,50	35,75	45,68	35,55	45,43
<b>Sódio</b>	9,30	9,30	11,33	11,33	4,13	4,13	3,87	3,87
<b>Cromo</b>	2,14	3,00	52,86	74,00	12,86	18,00	27,86	39,00
<b>Vitamina C</b>	0,49	0,59	0,52	0,63	0,85	1,02	0,95	1,14
<b>Vitamina E</b>	3,40	3,40	3,27	3,27	6,70	6,70	7,20	7,20
<b>Niacina</b>	5,88	6,71	6,00	6,86	9,75	11,14	9,59	10,96

<sup>a</sup>Percentual de contribuição calculado com base nas *Recommended Dietary Allowance* para adultos com idade entre 19 e 59 anos (*Institute of Medicine*, 2001,2005, 2011).

\*19-50: faixa etária utilizada para cálculo do percentual de contribuição de cálcio e ferro (para mulheres).

### 3.5 Perfil e escore de aminoácidos

Foram identificados aminoácidos indispensáveis e dispensáveis nas farinhas de inseto desenvolvidas; dentre eles, o mais abundante foi o glutamato, enquanto o menos abundante, a cisteína (Tabela 5).

Em relação ao estágio de desenvolvimento nas farinhas de *Gryllus assimilis*, não houve diferenças entre GA e GN quanto ao perfil de aminoácidos. A farinha de pupa de *Tenebrio molitor* (TP) apresentou maiores concentrações de aspartato, serina, glutamato, histidina, treonina, tirosina, valina, isoleucina, leucina e fenilalanina quando comparada à farinha de larva da mesma espécie (Tabela 5).

**Tabela 5.** Perfil de aminoácidos de farinhas de *Gryllus assimilis* e *Tenebrio molitor* em dois estágios de desenvolvimento.

Aminoácido	<i>Gryllus assimilis</i>		<i>Tenebrio molitor</i>	
	Ninfa (GN)	Ninfa (GN)	Larva (TL)	Pupa (TP)
<b>Aspartato</b>	2,84±0,08 <sup>ab</sup>	2,71±0,21 <sup>b</sup>	2,58±0,04 <sup>b</sup>	3,21±0,02 <sup>a*</sup>
<b>Serina</b>	2,33±0,01 <sup>a</sup>	1,84±0,23 <sup>b</sup>	2,00±0,01 <sup>ab</sup>	2,30±0,00 <sup>ab*</sup>
<b>Glutamato</b>	3,78±0,11 <sup>b</sup>	4,06±0,33 <sup>b</sup>	3,95±0,05 <sup>b</sup>	5,13±0,02 <sup>a*</sup>
<b>Glicina</b>	2,81±0,16 <sup>a</sup>	2,49±0,30 <sup>a</sup>	2,34±0,00 <sup>a</sup>	2,50±0,03 <sup>a</sup>
<b>Histidina</b>	1,24±0,05 <sup>ab</sup>	1,16±0,13 <sup>c</sup>	1,47±0,01 <sup>ab</sup>	1,73±0,04 <sup>a*</sup>
<b>Arginina</b>	2,98±0,12 <sup>a</sup>	3,02±0,30 <sup>a</sup>	2,41±0,01 <sup>a</sup>	2,88±0,02 <sup>a*</sup>
<b>Treonina</b>	1,72±0,01 <sup>a</sup>	1,66±0,18 <sup>a</sup>	1,62±0,02 <sup>a</sup>	1,89±0,03 <sup>a*</sup>
<b>Alanina</b>	2,87±0,01 <sup>a</sup>	2,76±0,32 <sup>ab</sup>	2,05±0,03 <sup>c</sup>	2,17±0,01 <sup>bc</sup>
<b>Prolina</b>	2,51±0,02 <sup>a</sup>	2,40±0,28 <sup>a</sup>	2,61±0,02 <sup>a</sup>	2,46±0,01 <sup>a</sup>
<b>Tirosina</b>	2,54±0,11 <sup>c</sup>	3,11±0,37 <sup>bc</sup>	3,46±0,05 <sup>ab</sup>	4,04±0,11 <sup>a*</sup>
<b>Valina</b>	2,17±0,03 <sup>ab</sup>	2,14±0,18 <sup>ab</sup>	2,08±0,01 <sup>b</sup>	2,53±0,07 <sup>a*</sup>
<b>Lisina</b>	1,79±0,08 <sup>a</sup>	1,95±0,13 <sup>a</sup>	1,74±0,02 <sup>a</sup>	1,68±0,72 <sup>a</sup>
<b>Isoleucina</b>	1,50±0,02 <sup>b</sup>	1,44±0,10 <sup>b</sup>	1,43±0,00 <sup>b</sup>	1,74±0,01 <sup>a*</sup>
<b>Leucina</b>	3,08±0,01 <sup>a</sup>	2,87±0,28 <sup>a</sup>	2,75±0,02 <sup>a</sup>	3,25±0,02 <sup>a*</sup>
<b>Fenilalanina</b>	2,48±0,84 <sup>a</sup>	1,82±0,16 <sup>a</sup>	1,92±0,01 <sup>a</sup>	2,23±0,01 <sup>a*</sup>
<b>Cisteína</b>	0,74±0,03 <sup>a</sup>	0,69±0,05 <sup>ab</sup>	0,60±0,02 <sup>b</sup>	0,56±0,02 <sup>b</sup>
<b>Metionina</b>	1,04±0,03 <sup>a</sup>	0,97±0,08 <sup>ab</sup>	0,81±0,00 <sup>b</sup>	0,83±0,08 <sup>ab</sup>

Valores expressos em g de aminoácido/100 g de amostra, base de peso seco como média ± desvio padrão. Médias nas linhas seguidas por diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste ANOVA seguido de posthoc Tukey ( $p < 0,05$ ). \*Representa a diferença intra espécie em relação aos diferentes estágios de desenvolvimento avaliado pelo Teste t-Student. GA: Farinha de *Gryllus assimilis* adulto; GN: Farinha de ninfa de *Gryllus assimilis*; TL: Farinha de larva de *Tenebrio molitor*; TP: Farinha de pupa de *Tenebrio molitor*.

As farinhas de *Gryllus assimilis* e *Tenebrio molitor* mostraram-se boas fontes de vários aminoácidos essenciais como histidina, treonina, aminoácidos sulfurados e aminoácidos aromáticos. A concentração desses aminoácidos atendeu ao padrão sugerido pela FAO/OMS como exigência desses aminoácidos para adultos (Tabela 6). No entanto, a lisina foi o primeiro aminoácido limitante nas farinhas ambas as espécies.

Com exceção dos aminoácidos sulfurados, TP apresentou maiores escores para todos os aminoácidos avaliados quando comparado às demais farinhas desenvolvidas. Não houve diferenças entre os dois estágios de desenvolvimento quanto ao escore de aminoácidos essenciais das farinhas obtidas de *Gryllus assimilis*. Entretanto, quando comparado com TL, a farinha de pupa de *Tenebrio molitor* (TP) apresentou maior escore para os aminoácidos histidina, isoleucina, leucina, lisina, treonina, valina e aminoácidos aromáticos (Tabela 6).

**Tabela 6.** Escore de aminoácidos essenciais de farinhas de *Gryllus assimilis* e *Tenebrio molitor* em dois estágios de desenvolvimento com base nos padrões de requerimento da FAO aminoácidos para adultos

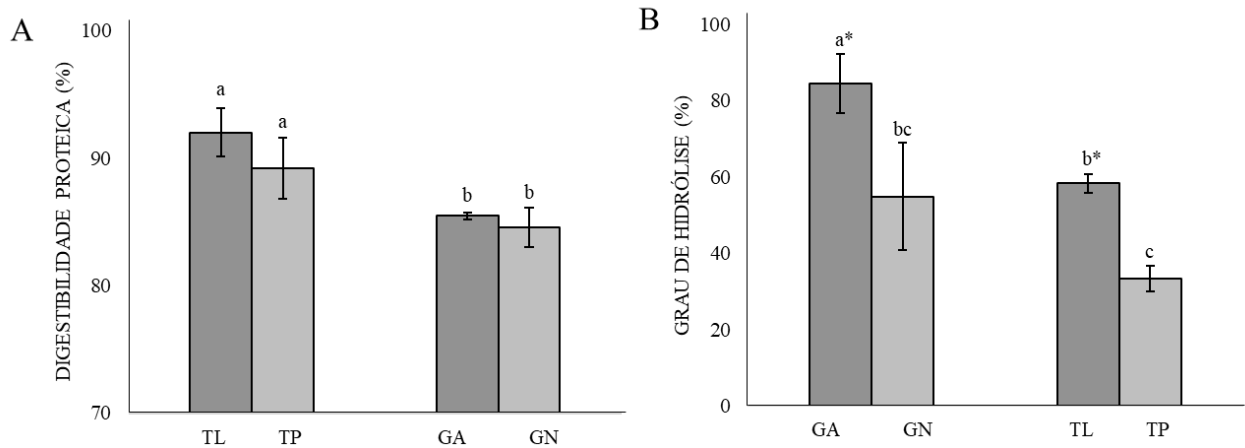
Aminoácido	<i>Gryllus assimilis</i>		<i>Tenebrio molitor</i>	
	Ninfa (GN)	Ninfa (GN)	Larva (TL)	Pupa (TP)
<b>Histidina</b>	1,15±0,03 <sup>c</sup>	1,07±0,08 <sup>c</sup>	1,59±0,02 <sup>b</sup>	1,85±0,03 <sup>a*</sup>
<b>Isoleucina</b>	0,74±0,01 <sup>c</sup>	0,71±0,03 <sup>c</sup>	0,83±0,00 <sup>b</sup>	1,00±0,01 <sup>a*</sup>
<b>Leucina</b>	0,75±0,00 <sup>c</sup>	0,69±0,5 <sup>c</sup>	0,78±0,01 <sup>b</sup>	0,92±0,00 <sup>a*</sup>
<b>Lisina</b>	0,55±0,02 <sup>c</sup>	0,60±0,03 <sup>bc</sup>	0,63±0,01 <sup>b</sup>	0,79±0,00 <sup>a*</sup>
<b>Treonina</b>	1,02±0,00 <sup>c</sup>	1,00±0,05 <sup>c</sup>	1,13±0,02 <sup>b</sup>	1,31±0,01 <sup>a*</sup>
<b>Valina</b>	0,81±0,01 <sup>c</sup>	0,79±0,05 <sup>c</sup>	0,90±0,00 <sup>b</sup>	1,08±0,00 <sup>a*</sup>
<b>SAA</b>	1,15±0,03 <sup>a</sup>	1,07±0,06 <sup>a</sup>	1,06±0,02 <sup>a</sup>	1,04±0,05 <sup>a</sup>
<b>AAA</b>	1,58±0,57 <sup>c</sup>	1,77±0,13 <sup>c</sup>	2,23±0,04 <sup>b</sup>	2,64±0,03 <sup>a*</sup>

Valores expressos em média ± desvio padrão. Médias nas linhas seguidas por diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste ANOVA seguido de posthoc Tukey ( $p < 0,05$ ). \*Representa a diferença intra espécie em relação aos diferentes estágios de desenvolvimento avaliado pelo Teste t-Student. GA: Farinha de *Gryllus assimilis* adulto; GN: Farinha de ninfa de *Gryllus assimilis*; TL: Farinha de larva de *Tenebrio molitor*; TP: Farinha de pupa de *Tenebrio molitor*. SAA: Aminoácidos Sulfurados; AAA: Aminoácidos aromáticos.

### 3.6 Digestibilidade proteica *in vitro* e grau de hidrólise

Elevado percentual de digestibilidade proteica foi observado nas farinhas desenvolvidas, variando de 84,58 a 92,03% (Figura 3 A). As farinhas de *Tenebrio molitor* apresentaram maior digestibilidade proteica em comparação com aquelas desenvolvidas a partir de *Gryllus assimilis*. O percentual de digestibilidade proteica não diferiu intra espécie em relação aos diferentes estágios de desenvolvimento.

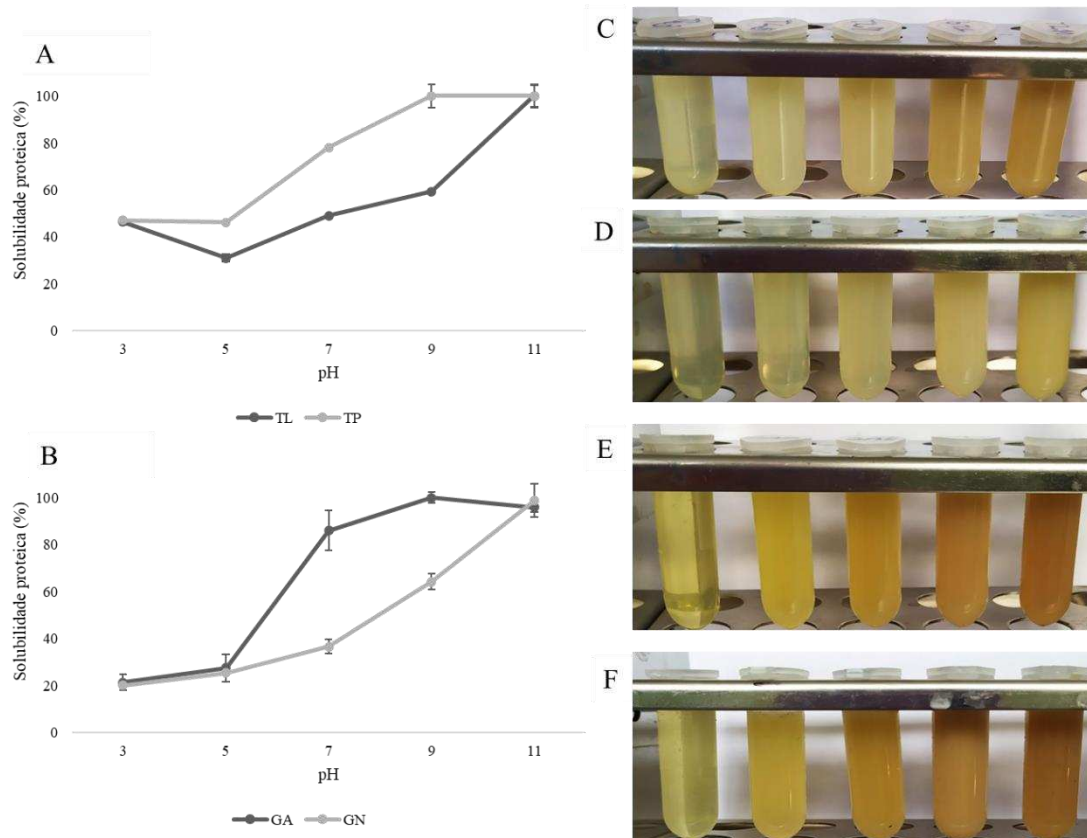
Ao comparar a proteína digerida enzimaticamente com uma amostra hidrolisada quimicamente, foi possível observar um grau de hidrólise variando amplamente entre 33,36 a 84,60% (Figura 3 B). A farinha desenvolvida a partir da pupa de *Tenebrio molitor* (TP) apresentou menor grau de hidrólise do que as demais proteínas analisadas (33,36%). A comparação intra espécies demonstrou que o estágio de desenvolvimento influenciou no GH em ambas as espécies.



**Figura 3.** Digestibilidade proteica (A) e grau de hidrólise após a digestão enzimática (B) de farinhas de *Tenebrio molitor* e *Gryllus assimilis* em dois estágios de desenvolvimento. Médias seguidas por diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste ANOVA seguido de posthoc Tukey ( $p < 0,05$ ). \*Representa a diferença entre o grau de hidrólise entre as espécies de acordo com estágio de desenvolvimento de acordo com o teste t-Student ( $p < 0.05$ ). Farinha de *Gryllus assimilis* adulto (GA); Farinha de ninfa de *Gryllus assimilis* (GN); Farinha de larva de *Tenebrio molitor* (TL); Farinha de pupa de *Tenebrio molitor* (TP).

### 3.7 Solubilidade

Verificou-se que a solubilidade das proteínas contidas nas farinhas de ambas as espécies de insetos é altamente dependente do pH (Figura 4, A e B). Em todas as amostras, as proteínas apresentaram maior solubilidade na região alcalina em pH 11, o que também pode ser visto ao observar o sobrenadante da suspensão proteica em diferentes pHs (Figura 4 C, D, E e F).



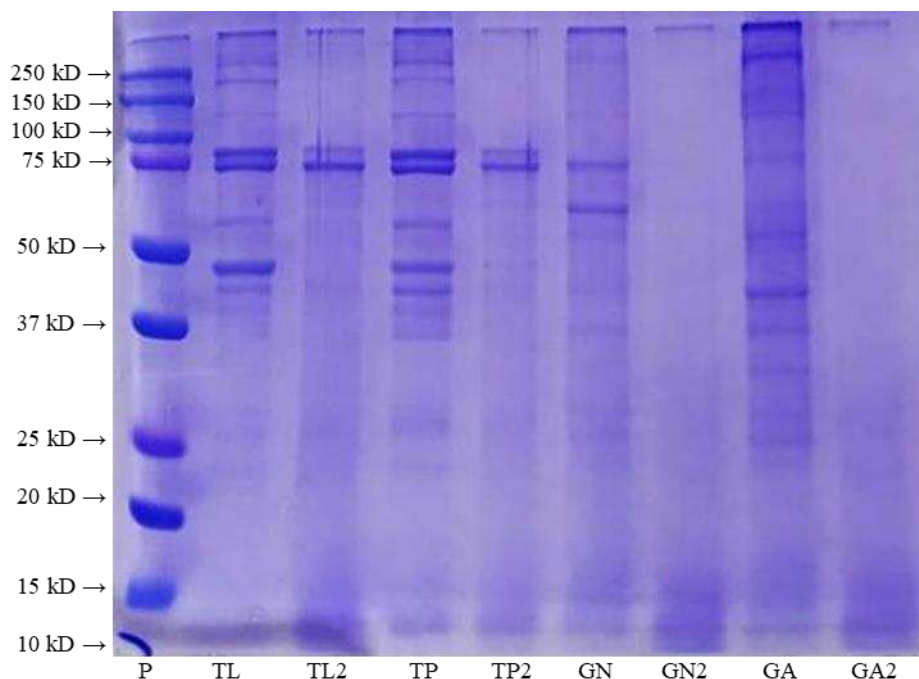
**Figura 4.** Solubilidade proteica de farinhas de *Tenebrio molitor* e *Gryllus assimilis* em dois estágios de desenvolvimento. A: Solubilidade proteica de farinhas de larva e pupa de *Tenebrio molitor* em razão do pH. B: Solubilidade proteica de farinhas de *Gryllus assimilis* adulto e ninfa em razão do pH. C e D: Sobrenadante da suspensão proteica em diferentes pHs de larva (TL) e pupa (TP) de *Tenebrio molitor*, respectivamente. E e F: Sobrenadante da suspensão proteica em diferentes pHs de farinha de *Gryllus assimilis* adulto (GA) e ninfa (GN), respectivamente.

### 3.8 Caracterização do perfil proteico

SDS-PAGE foi feito para verificar como a digestão *in vitro* influenciou os perfis de proteínas. A Figura 6 mostra os perfis de proteínas das amostras não digeridas (TL, TP, GN e GA) seguidas do sobrenadante de sua digestão enzimática (TL2, TP2, GN2 e GA2). Para ambas as espécies de insetos, os perfis de proteínas das farinhas antes e após a digestão são claramente diferentes (Figura 5).

Nos extratos das farinhas de larva e pupa de *Tenebrio molitor*, após a digestão *in vitro* houve diminuição do número e intensidade das bandas. O processo enzimático foi capaz de digerir principalmente as proteínas de menor peso molecular. No entanto, duas bandas principais, caracterizadas por pesos moleculares de 75 kD e 85 kD, ainda foram dominantes nos sobrenadantes, demonstrando a presença de proteína solúvel não digerida mesmo após o processo enzimático.

Para as farinhas de *Gryllus assimilis* (GN e GA), houve desaparecimento de grande parte das bandas de proteínas, o que corrobora com o elevado percentual de grau de hidrólise observado para essas amostras.



**Figura 5.** SDS-PAGE com marcador em kD (P) de farinhas de insetos comestíveis em dois estágios de desenvolvimento e seus extratos após a digestão enzimática. Farinha de larva de *Tenebrio molitor* (TL); Farinha de larva de *Tenebrio molitor* digerida enzimaticamente (TL2); Farinha de pupa de *Tenebrio molitor* (TP); Farinha de pupa de *Tenebrio molitor* digerida enzimaticamente (TP2); Farinha de ninfa de *Gryllus assimilis* (GN); Farinha de ninfa de *Gryllus assimilis* digerida enzimaticamente (GN2); Farinha de *Gryllus assimilis* adulto (GA); Farinha de *Gryllus assimilis* adulto (GA2) digerida enzimaticamente.

#### 4. DISCUSSÃO

O conteúdo nutricional dos insetos comestíveis relatados na literatura é amplamente diversificado, principalmente devido à variedade de espécies existentes. Os valores nutricionais podem variar consideravelmente mesmo dentro de um grupo de insetos, dependendo do estágio de metamorfose, origem do inseto e sua dieta (KOUŘIMSKÁ; ADÁMKOVÁ, 2016). Da mesma forma, o valor nutricional varia também de acordo com o preparo e processamento aplicados antes do consumo tais como métodos de secagem e cozimento (HUIS et al., 2013).

As farinhas desenvolvidas no presente estudo apresentaram em sua composição aproximadamente 67% de proteína para a espécie *Gryllus assimilis* e 57% para as farinhas de *Tenebrio molitor*. Xiaoming et al. (2010) revisaram o conteúdo de proteína em 100 espécies de insetos e observaram valores variando de 13 a 77% por matéria seca, refletindo a grande variabilidade das espécies testadas (XIAOMING et al., 2010).

As proteínas dietéticas fornecem aminoácidos e nitrogênio para a síntese de proteínas do corpo e outros compostos vitais para a sobrevivência, e estão envolvidas em quase todos os processos metabólicos e fisiológicos (SHEVKANI; CHOURASIA, 2021). Portanto, um fornecimento de quantidades adequadas de proteínas por meio da dieta é essencial para manter o crescimento, manutenção dos órgãos e outros processos metabólicos (SHEVKANI; CHOURASIA, 2021). As farinhas desenvolvidas no presente estudo podem ser classificadas como excelentes fontes de proteína dietética, representando potencial alternativa para atingir às necessidades proteicas na alimentação humana.

Considerando que a qualidade da proteína relacionada à nutrição humana depende, em grande parte, da composição de aminoácidos, a qualidade da proteína das farinhas de inseto se destaca por apresentar todos os aminoácidos indispensáveis analisados. Observações semelhantes foram realizadas em abelha, gafanhoto, escaravelho, grilo doméstico, bicho-da-seda, lagarta de mariposa e cupim (FINKE, 2002; KÖHLER et al., 2019; et al., 2018).

As farinhas de *Gryllus assimilis* e *Tenebrio molitor* desenvolvidas podem ser consideradas boas fontes dos aminoácidos histidina, treonina, aminoácidos sulfurados e aminoácidos aromáticos, por atenderem às exigências desses aminoácidos para adultos (FAO, 2011). Os aminoácidos não podem ser sintetizados pelo corpo humano e, portanto, devem ser fornecidos ao corpo por meio da alimentação (MARTÍNEZ SANZ et al., 2018).

O termo "aminoácido limitante", usado para descrever o aminoácido essencial presente na menor quantidade em uma proteína alimentar, também se refere a um aminoácido essencial que não atende aos requisitos mínimos para humanos (LOPEZ; MOHIUDDIN, 2022). A lisina, o aminoácido limitante nas farinhas desenvolvidas, é também um aminoácido limitante em proteínas de cereais e na maioria das dietas (TOMÉ; BOS, 2007). Resultado semelhante foi encontrado em proteínas de larvas secas de mosca soldado negra (*Hermetia illucens L.*) (HUANG et al., 2019).

Metabolicamente, a lisina sintetiza a carnitina, que é necessária para o transporte de ácidos graxos para a mitocôndria para a  $\beta$ -oxidação. Diante disso, é importante ressaltar que, para uma ingestão adequada de aminoácidos, não é recomendado o consumo de insetos como única fonte proteica na dieta. A inserção de insetos na alimentação deve estar aliada a outras fontes proteicas como leguminosas, produtos lácteos e carnes, que são fontes importantes de lisina (GÓRSKA-WARSEWICZ et al., 2018). Além disso, cabe ressaltar que o objetivo da inserção de insetos na alimentação humana visa complementar o aporte proteico da dieta, e não substituir completamente as fontes de proteínas já consumidas.

A funcionalidade de uma proteína está relacionada as suas propriedades físico-químicas, que incluem a solubilidade, propriedades emulsificantes e espumantes e capacidade de absorção de água e óleo. Essas propriedades funcionais das proteínas podem afetar o processamento e a qualidade dos produtos alimentícios, além de seus atributos sensoriais, como textura, sabor, cor e aparência (LUPATINI et al 2016). Corroborando com dados da literatura, a solubilidade das proteínas de inseto no presente estudo foi dependente do pH, sendo mais solúveis em pH alcalino (BROGAN et al., 2021; BUSSLER et al., 2016; KIM et al., 2017; MISHYNA et al., 2019).

As características de solubilidade das farinhas de insetos desenvolvidas podem impactar negativamente na sua funcionalidade nutricional e tecno-funcional em formulações de alimentos. Visando melhorar sua funcionalidade, alguns tratamentos podem ser aplicados a uma proteína, tais como as técnicas de extração alcalina. A condição alcalina torna a proteína mais solúvel em meio de extração aquoso pela quebra da matriz na qual as proteínas estão presentes. Além disso, o pH alcalino também pode induzir mudanças na estrutura da proteína, que são desdobradas. Conseqüentemente, a abertura de sua estrutura faz com que seus grupos hidrofóbicos e sulfidril livre (-SH) fiquem expostos (MOMEN et al., 2021). Assim como algumas proteínas vegetais e animais, devido a sua solubilidade, esse tipo de método é comumente utilizado para recuperar proteínas de insetos (MOMEN et al., 2021).

Ainda, métodos de extração assistida por micro-ondas, solvente, ultrassom e hidrólise enzimática podem ser aplicados a fim de melhorar a funcionalidade e bioatividade de proteínas de insetos comestíveis (HALL et al., 2017; MINTAH et al., 2019; YOON et al., 2019).

A digestibilidade proteica estima a porcentagem das proteínas que são hidrolisadas pelas enzimas digestivas e absorvidas pelo organismo na forma de aminoácidos (PIRES et al., 2006). As proteínas das farinhas de inseto desenvolvidas apresentaram alta digestibilidade, demonstrada pelo elevado percentual de digestibilidade proteica *in vitro* e pelo resultado do perfil de proteínas no SDS-PAGE. Os métodos de digestibilidade de proteínas *in vitro* possuem alto grau de correlação com os resultados de digestibilidade *in vivo* por simularem as condições do processo digestivo por meio de enzimas proteolíticas, medindo a porcentagem de proteínas que são hidrolisadas por elas (RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ et al., 2022). Diante disso, nossos achados corroboram com a alegação de que as proteínas de insetos comestíveis possuem alta digestibilidade proteica.

Apesar de apresentarem menores percentuais de digestibilidade proteica, as farinhas de *Gryllus assimilis* obtiveram maior grau de hidrólise e desaparecimento das bandas de

proteína no SDS-PAGE, sendo possível concluir que a digestão enzimática foi mais eficiente nas farinhas dessa espécie.

Todas as farinhas desenvolvidas e analisadas podem ser classificadas como excelentes fontes de fósforo, cobre, ferro, zinco e manganês, como boas fontes de magnésio e como fonte de potássio. Alguns estudos também observaram alta concentração de minerais em insetos comestíveis (FINKE, 2002; MLCEK et al., 2014; RUMPOLD; SCHLÜTER, 2013).

O rico conteúdo em minerais das farinhas de inseto demonstra seu potencial de utilização como ingrediente em produtos pela indústria de alimentos, sendo essa uma maneira de adicionar valor nutricional as preparações. Segundo Kosečková et al. (2022), a substituição de 10 % da farinha de trigo por pó de grilo em receitas de pães e massas aumenta a concentração de zinco em aproximadamente 90-100% (KOSEČKOVÁ et al., 2022).

O papel da niacina como micronutriente antioxidante foi estabelecido por meio da retenção do ciclo *redox* da glutatona e também a diminuição da relação NADPH/NADP<sup>+</sup> total, (ILKHANI; HOSSEINI; SAEDISOMEOLIA, 2016). A vitamina B<sub>3</sub> também possui papel fundamental na saúde neuronal (GASPERI et al., 2019). Sendo assim, as farinhas de *Gryllus assimilis* e *Tenebrio molitor*, fontes de niacina, podem promover benefícios antioxidantes e neuronais na saúde do consumidor.

## 5. CONCLUSÃO

As farinhas de *Tenebrio molitor* e *Gryllus assimilis* são excelentes fontes de proteínas, fósforo, cobre, ferro, zinco, manganês, boas fontes de magnésio e fonte de potássio e niacina. Apresentam elevado conteúdo de proteínas com boa digestibilidade e maior solubilidade em pH alcalino. As farinhas desenvolvidas atendem às exigências de histidina, treonina, aminoácidos sulfurados e aminoácidos aromáticos, entretanto, a lisina é o aminoácido limitante para ambas as espécies analisadas. O estágio de desenvolvimento é capaz de influenciar o conteúdo nutricional, perfil de aminoácidos e propriedades funcionais da proteína dos insetos, sendo assim, *Gryllus assimilis* adulto e a pupa de *Tenebrio molitor* se destacaram em relação às ninfas e larvas das respectivas espécies. Diante do exposto, as farinhas desenvolvidas a partir de insetos possuem grande potencial como ingredientes para fins industriais, agregando valor nutricional e boas propriedades tecnológicas aos produtos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (19th ed.). Gaithersburg:AOAC. 2012.

BLOOR, S. J. Overview of methods for analysis and identification of flavonoids. **Methods in Enzymology**, 335, 3–14. 2001.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 359, de 23 de dezembro de 2003. Disponível em: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2003/anexo/anexo\\_res0359\\_23\\_12\\_2003.pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2003/anexo/anexo_res0359_23_12_2003.pdf). Acesso em 22 jul. 2022.

BROGAN, E. N. et al. Characterization of protein in cricket (*Acheta domesticus*), locust (*Locusta migratoria*), and silk worm pupae (*Bombyx mori*) insect powders. **LWT**, v. 152, p. 112314, 2021.

BUCHHOLZ, A. C., SCHOELLER, D. A. Is a calorie a calorie?, **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.79, n. 5, p. 899S–906S.

BUSSLER, S. et al. Recovery and techno-functionality of flours and proteins from two edible insect species: Meal worm (*Tenebrio molitor*) and black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. **Heliyon**, v. 2, n. 12, p. e00218, 2016.

CAMPOS, F. M et al. Optimization of methodology to analyze ascorbic and dehydroascorbic acid in vegetables. **Quimica Nova**, 32, 87-91. 2009.

FAO. Dietary protein quality evaluation in human nutrition Report of an FAO Expert Consultation. . Auckland: [s.n.] , 2011

FAO; PROGRAMME, World Food. The state of food insecurity in the world. Notes, p. 1–61, 2009. Disponível em: <<https://digitallibrary.un.org/record/3927682>>. Acesso em: 14 ago. 2022.

FINKE, M. D. Complete nutrient composition of commercially raised invertebrates used as food for insectivores. **Zoo Biology**, v. 21, n. 3, p. 269–285, 2002.

FRAQUEZA, M. J. R.; COUTINHO PATARATA, Luis Avelino da Silva. Constraints of HACCP Application on Edible Insect for Food and Feed. Future Foods. [S.l.]: IntechOpen, 2017.

GASPERI, V. et al. Niacin in the Central Nervous System: An Update of Biological Aspects and Clinical Applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 4, p. 974. 2019.

GKINALI, A. A. et al. Potentiality of *Tenebrio molitor* larva-based ingredients for the food industry: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 119, p. 495–507, 2022.

GÓRSKA-WARSEWICZ, H. et al. Food Products as Sources of Protein and Amino Acids—The Case of Poland. **Nutrients** 2018, Vol. 10, Page 1977, v. 10, n. 12, p. 1977, 2018.

HALL, F. G. et al. Functional properties of tropical banded cricket (*Gryllobates sigillatus*) protein hydrolysates. **Food chemistry**, v. 224, p. 414-422, 2017.

HUANG, C. et al. Impact of drying method on the nutritional value of the edible insect protein from black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) larvae: amino acid composition, nutritional value evaluation, in vitro digestibility, and thermal properties. **European Food Research and Technology**, v. 245, n. 1, p. 11–21, 2019.

ILKHANI, F.; HOSSEINI, B.; SAEDISOMEOLIA, A. Niacin and Oxidative Stress: A Mini-Review. **J Nutri Med Diet Care**, v. 2, n. 1, p. 14, 2016.

INSTITUTE OF MEDICINE. Dietary reference intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D, and fluoride. Washington (DC): National Academy Press; 1997

INSTITUTE OF MEDICINE. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids. Washington (DC): National Academy Press; 2005

INSTITUTE OF MEDICINE. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. Washington (DC): National Academy Press; 2002.

KIM, H. W. et al. Effect of House Cricket (*Acheta domesticus*) Flour Addition on Physicochemical and Textural Properties of Meat Emulsion Under Various Formulations. **Journal of Food Science**, v. 82, n. 12, p. 2787–2793, 2017.

KÖHLER, R. et al. Protein, amino acid and mineral composition of some edible insects from Thailand. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 22, n. 1, p. 372–378, 2019.

KOOH, P. et al. Entomophagy and Public Health: A Review of Microbiological Hazards. **Health**, v. 11, n. 10, p. 1272–1290, 2019.

KOSEČKOVÁ, P. et al. Mineral profile of cricket powders, some edible insect species and their implication for gastronomy. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 107, p. 104340, 2022.

KOUŘIMSKÁ, L.; ADÁMKOVÁ, A. Nutritional and sensory quality of edible insects. **NFS Journal**, v. 4, p. 22–26, 2016.

LIU H. J. et al. Determination of Amino Acids in Food and Feed by Derivatization with 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate and Reversed-Phase Liquid Chromatographic Separation, **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v.78, 3, 1995.

LOPEZ, M. J.; MOHIUDDIN, S. S. Biochemistry, Essential Amino Acids. StatPearls, 2022. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557845/>>. Acesso em: 16 ago. 2022.

LUPATINI, A. L. et al Potential application of microalga *Spirulina platensis* as a protein source. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 97, n. 3, p. 724-732, 2017.

MACHADO, C.R.; THYS, R.C.S. Cricket powder (*Gryllus assimilis*) as a new alternative protein source for gluten-free breads. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 56, p. 102180, 2019.

MALLA, N et al. Some Insect Species Are Good-Quality Protein Sources for Children and Adults: Digestible Indispensable Amino Acid Score (DIAAS) Determined in Growing Pigs. **J. Nutr.**, 152 (4), 1042–1051. 2022.

MARTÍNEZ SANZ, J.M. et al. An Overview on Essential Amino Acids and Branched Chain Amino Acids. Nutrition and Enhanced Sports Performance: Muscle Building, Endurance, and Strength, p. 509–519, 2018.

MELGAR-LALANNE, G.; HERNÁNDEZ-ÁLVAREZ, A; SALINAS-CASTRO, A. Edible insects processing: Traditional and innovative technologies. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, n. 4, p. 1166-1191, 2019.

MENDES, F.Q. et al. Capability of in vitro digestibility methods to predict in vivo digestibility of vegetal and animal proteins. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 66, n. 1, p. 5–16, 2016.

MEYER-ROCHOW, V. B. et al. Chemical Composition, Nutrient Quality and Acceptability of Edible Insects Are Affected by Species, Developmental Stage, Gender, Diet, and Processing Method. **Foods**, 2021, Vol. 10, Page 1036, v. 10, n. 5, p. 1036, 2021.

MINTAH, B. K. et al., Techno-functional attribute and antioxidative capacity of edible insect protein preparations and hydrolysates thereof: Effect of multiple mode sonochemical action. **Ultrasonics Sonochemistry** , v. 58, p. 104676, 2019.

MISHYNA, M. et al. Extraction, characterization and functional properties of soluble proteins from edible grasshopper (*Schistocerca gregaria*) and honey bee (*Apis mellifera*). **Food Research International**, v. 116, p. 697–706, 2019.

MLCEK, J. et al. A comprehensive look at the possibilities of edible insects as food in Europe - A Review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 64, n. 3, p. 147–157, 2014.

MOMEN, S.; ALAVI, F.; AIDER, M. Alkali-mediated treatments for extraction and functional modification of proteins: Critical and application review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 110, p. 778-797, 2021.

MUTUNGI, C. et al. Postharvest processes of edible insects in Africa: A review of processing methods, and the implications for nutrition, safety and new products development. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 2, p. 276-298, 2019.

NASEEM, R. et al. Entomophagy: an innovative nutritional and economic navigational tool in race of food security. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 41, n. 3, p. 2211–2221, 2021.

INJE, O. F. et al. Protein quality of four indigenous edible insect species in Nigeria. **Food Science and Human Wellness**, v. 7, n. 2, p. 175–183, 2018.

PHILIPPI, S. T. Pirâmide dos alimentos: princípios básicos da nutrição. Nutrição e Técnica dietética. Barueri: Manole. 2008.

PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. et al. Carotenoid retention and vitamin A value in carrot (*Daucus carota* L.) prepared by food service. **Food Chemistry**, v.61, n. 1-2, p.145-151, 1998.

PINHEIRO-SANT'ANA, H. et al. stability of b-vitamins in meats prepared by foodservice. 2. riboflavin. **Foodservice Research International**, v. 11, n. 1, p. 53-67, 1999.

PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. et al. Stability of B-vitamins in meats prepared by foodservice. 3. Nicotinic Acid. **Foodservice Research International**, v. 11, n. 1, p. 69-82, 1999.

PINHEIRO-SANT'ANA, G. et al. Method for simultaneous analysis of eight vitamin E isomers in various foods by high performance liquid chromatography and fluorescence detection. **Journal of Chromatography**. v. 1218, n. 47, p. 8496-8502, 2011.

Pires, C. V. et al. Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes protéicas. **Food Science and Technology**. v. 26, n. 1, p. 179-187. 2006.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. A guide to carotenoid analysis in foods. Washington: ISLI press. 2001

RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, María et al. In Vitro Crude Protein Digestibility of Insects: A Review. **Insects**, v. 13, n. 8, p. 682, 2022.

RUMPOLD, Birgit A.; SCHLÜTER, O. K. Nutritional composition and safety aspects of edible insects. **Molecular nutrition & food research**, v. 57, n. 5, p. 802–823, 2013.

SARRUGE, J. R.; HAAG, H. P. Análise química de plantas. Piracicaba: ESALQ. 1974

SHEVKANI, K.; CHOURASIA, S. Dietary Proteins: Functions, Health Benefits and Healthy Aging. In: RATTAN, S.I.S.; KAUR, G. (Org.). . Nutrition, Food and Diet in Ageing and Longevity. [S.l.]: Springer, Cham, 2021. v. 14. p. 3–37. Disponível em: <[https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-83017-5\\_1](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-83017-5_1)>. Acesso em: 16 ago. 2022.

SINGLETON, V. L., ORTHOFER, R., & LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, 299, 152–178. 1999

TOMÉ, Daniel; BOS, Cécile. Lysine Requirement through the Human Life Cycle. **The Journal of Nutrition**, v. 137, n. 6, p. 1642S-1645S, 2007.

UNITED NATIONS. World population prospects. New York: United Nations Publications; 2017. Disponível em: <https://population.un.org/wpp/>. Acesso em: 12 jun. 2022.

VANDEWEYER, D. et al. Effect of blanching followed by refrigerated storage or industrial microwave drying on the microbial load of yellow mealworm larvae (*Tenebrio molitor*). **Food Control**, v. 71, p. 311–314, 2017.

XIAOMING, C et al. Review of the nutritive value of edible insects. Forest insects as food: humans bite back, 2010.

YOON, S. et al. Comparative characterization of protein hydrolysates from three edible insects:

Mealworm larvae, adult crickets, and silkworm pupae. **Foods**, v. 8, n. 11, p. 563, 2019.

### 6.3 ARTIGO 3 (Comunicação breve):

#### **Desenvolvimento e caracterização de farinha de barata d'água (*Belostoma anurum*) com potencial de uso na alimentação humana**

##### **RESUMO**

O potencial de insetos comestíveis como um novo ingrediente em produtos de alto valor agregado tem sido investigado visando encontrar alternativas às fontes convencionais de proteínas. O objetivo desse estudo foi desenvolver e caracterizar nutricionalmente a farinha de *Belostoma anurum*. A farinha desenvolvida foi analisada quanto à sua composição centesimal, conteúdo de minerais e perfil de aminoácidos. O percentual de contribuição para o suprimento das recomendações diárias de nutrientes foi calculado. A farinha desenvolvida a partir de *Belostoma anurum* apresentou elevado conteúdo proteico (69,01%), seguido pelo conteúdo de carboidratos (19,86%), lipídico (6,08%) e de cinzas (5,05%). A farinha pode ser considerada excelente fonte de proteína, fósforo, cobre, ferro, zinco, manganês e cromo. Além disso, mostrou-se boa fonte de histidina, treonina, de aminoácidos sulfurado e de aminoácidos aromáticos. A lisina foi o aminoácido limitante na farinha. Diante do exposto, a adição da farinha de *Belostoma anurum* em produtos e preparações deve ser considerada pela indústria de alimentos com o objetivo de agregar valor nutricional aos mesmos. Entretanto, ainda são necessários estudos que avaliem a segurança do uso dessa farinha na alimentação humana, bem como estudos relacionados ao desenvolvimento de técnicas de criação que viabilizem a produção dessa farinha em escala industrial de maneira economicamente viável.

**Palavras chave:** entomofagia; farinhas de insetos; insetos comestíveis; composição nutricional; aminoácidos.

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo estimativas atuais, a demanda mundial por proteínas de origem animal deverá dobrar até o ano de 2050 devido às expectativas de uma população mundial de 9 bilhões até esse mesmo ano (FAO, 2013). Entretanto, as mudanças climáticas, a superexploração ambiental e a redução gradual de áreas férteis afetam negativamente a produção atual de proteínas (KIM et al, 2019). Diante disso, faz-se necessária a busca por novos meios de produção de alimentos de forma sustentável.

Recentemente, o potencial de insetos comestíveis como um novo ingrediente em produtos de alto valor agregado tem sido investigado, visando a encontrar alternativas às fontes convencionais de proteínas (GRAVEL; DOYEN, 2020). O consumo de insetos foi considerado como uma alternativa para suprir a demanda crescente de proteínas em todo o mundo. O alto conteúdo de proteína se destaca em sua composição, além disso, seu conteúdo de lipídios, minerais e vitaminas demonstra que os insetos são uma fonte promissora de nutrientes (RUMPOLD, SCHLUTER, 2013; VAN HUIS et al., 2013; ZIELIŃSKA et al., 2015).

Diferentes tipos de processamentos são aplicados aos insetos de modo a aumentar seu consumo e interesse do público (MELGAR-LALANNE et al., 2019). O desenvolvimento de farinhas a partir de insetos vem se tornando uma opção viável para agregar valor nutricional em preparações, utilizando-os como ingredientes em diferentes produtos alimentícios (BUßLER, 2016).

Insetos do gênero *belostoma* são comumente consumidos em países asiáticos, como a Tailândia, e são considerados fonte alternativa de proteína (POSHADRI et al., 2018). Entretanto, são escassos na literatura estudos que desenvolveram e avaliam a composição nutricional de farinhas de *Belostoma anurum*. Diante disso, o objetivo desse estudo foi desenvolver e caracterizar nutricionalmente farinha de *Belostoma anurum*.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

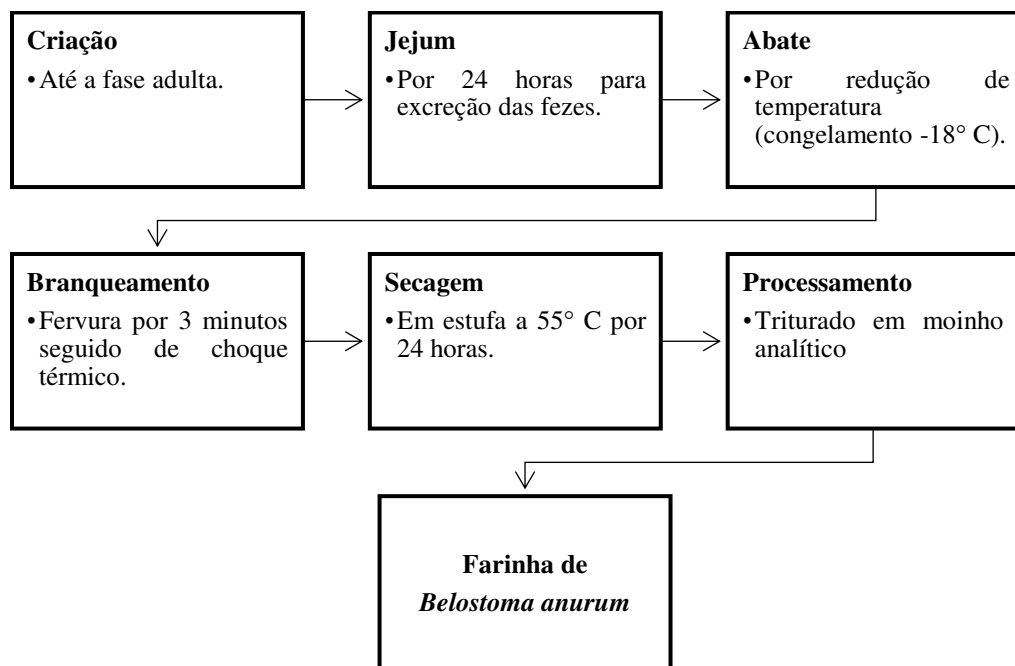
### 2.1 Criação dos insetos

As baratas d'água (*Belostoma anurum*) foram obtidas a partir de criação sob condições controladas ( $27 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $60 \pm 20\%$  UR, fotofase de 12 horas) (VALBON et al., 2018; CRUZ et al. 2021). Os adultos foram mantidos em aquário (30 x 40 x 60 cm) para que a cópula ocorresse livremente e, após, as fêmeas depositaram os ovos no hemiélitro de machos adultos. Os machos com ovos no hemiélitro foram individualizados em potes de plásticos perfurados (10,9 x 9,2 x 7,5 cm) colocados em bandejas com água e aquecedor. Após a emergência, as ninfas foram

individualizadas em frascos de vidro (30 mL) até o terceiro ínstar, para evitar o canibalismo. As ninfas, ao atingirem o terceiro ínstar, foram transferidas para recipientes de plástico maiores (100 mL). Ninfas do primeiro e do segundo ínstar foram alimentadas diariamente com larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). A partir de ninfas de terceiro ínstar foram alimentados com peixes do tipo guppy coletados no setor de piscicultura da UFV.

## 2.2 Produção da farinha

O abate e processamento dos insetos foi realizado conforme protocolo usualmente aplicado pela indústria para esse tipo de alimento (FRAQUEZA; COUTINHO PATARATA, 2017). Assim que atingiram a fase adulta, os insetos foram submetidos a jejum de 24 horas para excreção do conteúdo intestinal. O abate foi realizado por redução de temperatura (congelamento a  $-18^{\circ}\text{C}$  por 24 horas). Após o abate, os insetos passaram pelo processo de branqueamento visando a redução de sua contagem microbiana e a inativação de enzimas degradativas responsáveis pela deterioração dos alimentos (MELGAR-LALANNE et al., 2019). Nesse processo, os insetos foram submergidos em água fervente por 3 minutos, submetidos a choque térmico em água resfriada por um minuto e drenados com o auxílio de peneira (VANDEWEYER et al., 2017). Em seguida, os insetos foram secos em estufa com circulação de ar a  $55^{\circ}\text{C}$  por 24 horas e, por fim, triturados em moinho analítico até a obtenção da farinha (Figura 1). A farinha foi armazenada em freezer ( $-18^{\circ}\text{C}$ ) até o momento das análises.



**Figura 1.** Fluxograma de obtenção da farinha de *Belostoma anurum*.

### 2.3 Análise da composição centesimal

Para determinar a composição centesimal em base seca, a farinha foi analisada quanto ao teor de umidade, a qual foi determinada pelo método de secagem em estufa (105 °C por 24 h) (AOAC, 2012). O conteúdo de proteína bruta foi obtido por meio do método de ensaio *Kjeldahl*. O conteúdo de lipídios totais foi determinado usando a extração *Soxhlet* de acordo com o método 920.39 (AOAC, 2012). A incineração das amostras em um forno mufla foi conduzida para a obtenção do conteúdo de cinzas de acordo com o método 942.05 (AOAC, 2012). Os carboidratos foram estimados por meio de cálculo de diferença. Todas as análises são relatadas como valores médios ( $\pm$  desvio padrão) de três repetições expresso em g/100 g (base de peso seco).

### 2.4 Conteúdo de minerais

A digestão nitroperclórica dos elementos químicos seguiu a metodologia proposta por Sarruge & Haag (1974). A determinação dos elementos químicos foi realizada por espectrometria de emissão atômica em plasma indutivamente acoplado (ICP-AES) (Perkin Elmer, Optima 8300). Os resultados foram expressos em mg/100g em base seca.

### 2.5 Percentual de contribuição

As *Dietary Reference Intake (DRI)* do *Institute of Medicine* (IOM 1997; IOM 2002; IOM 2005) foram utilizadas para estimar o potencial de contribuição da farinha de *Belostoma anurum* no suprimento das recomendações diárias de proteínas, carboidratos e minerais. Uma porção de 50 g foi estipulada para os cálculos, baseando-se na RDC nº 359, de 23 de dezembro de 2003, que determina o tamanho de porções de farinhas e outros alimentos.

### 2.6 Aminoácidos

O perfil de aminoácidos foi determinado de acordo com os métodos AOAC (2000) e Liu et al. (1995). O escore de aminoácidos essenciais foi calculado com base no padrão sugerido de requisitos de aminoácidos pela FAO para adultos (FAO, 2011).

O escore químico de aminoácidos foi calculado usando a fórmula:

$$\text{Escore de aminoácidos} = \frac{\text{mg aminoácido em 1 g de proteína no alimento}}{\text{mg de aminoácido em 1 g de proteína de referência}}$$

### 3 RESULTADOS

Elevado conteúdo de proteína foi observado na farinha de *Belostoma anurum*, seguido por carboidratos e lipídios (Tabela 1). Fósforo, potássio e sódio foram os elementos químicos mais prevalentes na farinha enquanto cromo, manganês e cobre foram os minerais menos prevalentes (Tabela 1).

**Tabela 1.** Composição centesimal e elementos químicos de farinha de *Belostoma anurum*

<b>Composição centesimal</b>	
Umidade (%)	8,07±1,32
Lipídios (%)*	6,08±0,53
Cinzas (%)*	5,05±0,15
Proteínas (%)*	69,01±8,16
Carboidratos (%)*	19,86±1,37
VET (Kcal)*	406,76±2,42
<b>Elementos químicos (mg/100g)</b>	
Potássio	873±11,32
Fósforo	796±23,98
Sódio	547±21,19
Calcio	183±13,98
Magnésio	113±10,11
Zinco	30,87±2,98
Ferro	11,37±1,92
Manganês	1,16±0,01
Cobre	1,00±0,02
Cromo	0,04±0,00
Molibdênio	nd

\*Valores expressos em base seca como média de triplicatas ± desvio padrão. VET: Valor energético total em 100g da farinha. nd: não detectado

Diante do percentual de contribuição para o suprimento das recomendações diárias de nutrientes, a farinha desenvolvida a partir de *Belostoma anurum* pode ser considerada excelente fonte de proteína, fósforo, cobre, ferro, zinco, manganês e cromo (Tabela 3). Além disso, representa boa fonte de sódio e fonte de carboidrato, potássio, cálcio.

**Tabela 2.** Potencial de contribuição de farinha de *Belostoma anurum* para o suprimento das recomendações diárias de nutrientes para mulheres e homens na faixa etária de 19 a 59 anos, em uma porção estipulada de 50g.

Nutrientes	% de contribuição <sup>a</sup>	
	Homens	Mulheres
<b>Carboidrato</b>	7,64	7,64
<b>Proteína</b>	61,61	75,00
<b>Fósforo</b>	68,62	68,62
<b>Potássio</b>	9,29	9,29
<b>Cálcio*</b>	9,15	9,15
<b>Magnésio</b>	14,13	18,23
<b>Cobre</b>	55,81	55,81
<b>Ferro*</b>	71,06	31,58
<b>Zinco</b>	140,33	192,95
<b>Manganês</b>	25,16	32,15
<b>Sódio</b>	18,23	18,23
<b>Cromo</b>	57,86	81,00

<sup>a</sup>Percentual de contribuição calculado com base nas *Recommended Dietary Allowance* para adultos com idade entre 19 e 59 anos (*Institute of Medicine*, 2001,2005, 2011).

\*19-50: faixa etária utilizada para cálculo do percentual de contribuição de cálcio e ferro (para mulheres).

Foram identificados aminoácidos essenciais e não essenciais na farinha desenvolvida. O aminoácido mais prevalente na farinha de *Belostoma anurum* foi o glutamato, seguido de alanina e glicina. A cisteína representou o aminoácido menos abundante (tabela 3).

**Tabela 3.** Perfil de aminoácidos da farinha de *Belostoma anurum*.

Aminoácido	Farinha de <i>Belostoma anurum</i>
<b>Aspartato</b>	2,72±0,06
<b>Serina</b>	1,89±0,06
<b>Glutamato</b>	3,94±0,05
<b>Glicina</b>	2,94±0,10
<b>Histidina</b>	1,53±0,64
<b>Arginina</b>	3,01±0,06
<b>Treonina</b>	1,84±0,06
<b>Alanina</b>	3,46±0,12
<b>Prolina</b>	2,54±0,08
<b>Tirosina</b>	2,67±0,13
<b>Valina</b>	2,44±0,06
<b>Lisina</b>	1,88±0,03
<b>Isoleucina</b>	1,44±0,01
<b>Leucina</b>	2,79±0,05
<b>Fenilalanina</b>	1,71±0,04
<b>Cisteína</b>	0,77±0,00
<b>Metionina</b>	1,34±0,02

Valores expressos em g de aminoácido/100 g de amostra, base de peso seco como média ± desvio padrão.

A farinha de *Belostoma anurum* mostrou-se boa fonte de histidina, treonina, de aminoácidos sulfurados e de aminoácidos aromáticos, devido ao fato de atenderem ao padrão

sugerido pela FAO/OMS como exigência desses aminoácidos para adultos (Tabela 4). Em contrapartida, a lisina foi o aminoácido limitante na farinha.

**Tabela 4.** Escore químico de aminoácidos essenciais de farinha de *Belostoma anurum* com base nos padrões de requerimento da FAO aminoácidos para adultos.

<b>Aminoácido</b>	<b>Escore de aminoácido</b>
<b>Histidina</b>	1,84±0,06
<b>Isoleucina</b>	0,70±0,00
<b>Leucina</b>	0,66±0,01
<b>Lisina</b>	0,57±0,01
<b>Treonina</b>	1,07±0,04
<b>Valina</b>	0,89±0,02
<b>SAA</b>	1,33±0,01
<b>AAA</b>	1,55±0,06

Valores expressos em média ± desvio padrão.

#### 4 DISCUSSÃO

As proteínas são compostos nitrogenados complexos formados por aminoácidos ligados através de ligações peptídicas. Representam o segundo constituinte mais abundante no corpo humano, depois apenas da água (SHEVKANI; CHOURASIA, 2021). No entanto, não existem mecanismos de armazenamento de proteínas no corpo, fazendo-se necessário seu fornecimento através da dieta. As proteínas dietéticas fornecem aminoácidos e nitrogênio utilizados na síntese de proteínas do corpo e outros compostos vitais para a sobrevivência (SHEVKANI; CHOURASIA, 2021).

Quando fornece de 5 a 10% das *Dietary Reference Intake* (DRI), um alimento pode ser considerado "fonte" de algum nutriente; pode ser classificados como "boa fonte" quando supre de 10 a 20% das recomendações e, quando atende mais de 20%, como "excelente fonte" (PHILIPPI, 2008). Diante disso, considerando seu percentual de contribuição para o suprimento das recomendações diárias de nutrientes, a farinha desenvolvida a partir de *Belostoma anurum* representa uma excelente fonte de proteína.

O alto percentual de proteínas é característico de insetos comestíveis; muitas espécies descritas na literatura possuem em seu conteúdo aproximadamente 60% de proteína (FINKE, OONINCX, 2014; VAN HUIS, 2016). Sendo assim, as proteínas de insetos representam uma alternativa para promover a segurança alimentar e lidar com os desafios da desnutrição e

subnutrição nas áreas em desenvolvimento em um mundo cada vez mais populoso (NASEEM et al., 2021).

Por atender aos padrões de exigência para adultos, a farinha de *Belostoma anurum* pode ser considerada fonte dos aminoácidos histidina, treonina, de aminoácidos sulfurado e de aminoácidos aromáticos (FAO 2011). A histidina é um aminoácido essencial com papéis únicos no tamponamento de prótons, quelação de íons metálicos, eliminação de espécies reativas de oxigênio, eritropoiese e sistema histaminérgico (HOLEČEK, 2020). A treonina é fundamental para a produção de mucina no intestino e contribui significativamente para a formação de colágeno, elastina e esmalte dentário (CHAPMAN et al., 2009). Os aminoácidos contendo enxofre representam uma parte poderosa do sistema antioxidante celular (COLOVIC et al., 2018) e os aminoácidos aromáticos são precursores de vários neurotransmissores e reguladores metabólicos que desempenham um papel vital na regulação do metabolismo de nutrientes (MA et al., 2021).

O conteúdo de lipídios observado no presente estudo ( $6,08 \pm 0,53$  g/100 g) foi menor do que encontrado em insetos de mesma ordem revisados por Rumpold e Schuter (2013), que apresentaram, em média, 30,26% de lipídios em sua composição. Essas variações se dão pelas diferenças entre as espécies, regime de alimentação, tipo de processamento, fases de desenvolvimento e ambiente onde vivem (VAN HUIS e OONINCX 2017).

Quando se refere ao seu conteúdo mineral, a farinha de *Belostoma anurum* pode ser considerada rica em micronutrientes. A farinha desenvolvida é uma excelente fonte de fósforo, cobre, ferro, zinco, manganês e cromo, boa fonte de sódio e fonte de potássio e cálcio. Esses achados corroboram com a literatura, que afirma que insetos comestíveis possuem potencial de fornecer micronutrientes específicos, sendo sugerido, ainda, que seu consumo pode diminuir a deficiência de ferro e zinco em países em desenvolvimento (ZIELIŃSKA et al., 2015). Diante disso, a adição da farinha de *Belostoma anurum* em produtos e preparações deve ser considerada pela indústria de alimentos com o objetivo de agregar valor nutricional aos mesmos.

A lisina foi o aminoácido limitante na farinha desenvolvida, fato que demonstra que, apesar de seu rico valor nutricional, farinhas de insetos devem ser incorporadas em uma dieta saudável e variada onde outros alimentos fornecerão seus aminoácidos limitantes. Carnes e produtos lácteos são as principais fontes de lisina na alimentação e devem ser consumidas adicionalmente às proteínas de inseto (GÓRSKA-WARSEWICZ et al., 2018).

Apesar de seu gênero ser comumente consumido em alguns países (POSHADRI et al., 2018), ainda são necessários estudos que avaliem a segurança do uso de *Belostoma anurum* na alimentação humana, visto que essa espécie possui enzimas paralisantes em sua saliva, as quais são utilizadas na captura de presas (SILVA-CARDOSO et al., 2010). Até o momento, não há registros de malefícios à saúde humana produzidos por essas enzimas. Ainda, são necessários estudos e desenvolvimento de técnicas de criação que viabilizem a produção dessa farinha em escala industrial de maneira economicamente viável.

## 5 CONCLUSÃO

A farinha de *Belotoma anurum* é uma excelente fonte de proteína, fósforo, cobre, ferro, zinco, manganês e cromo. Além disso, mostrou-se boa fonte de histidina, treonina, de aminoácidos sulfurado e de aminoácidos aromáticos. Em contrapartida, a lisina foi o aminoácido limitante na farinha. A adição da farinha de *Belostoma anurum* em produtos e preparações pode ser considerada pela indústria de alimentos com o objetivo de agregar valor nutricional aos mesmos. Entretanto, ainda são necessários estudos que avaliem a segurança do seu uso na alimentação humana, bem como o desenvolvimento de técnicas de criação que viabilizem a produção dessa farinha em escala industrial de maneira economicamente viável.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (19th ed.). Gaithersburg:AOAC. 2012.
- BUßLER, S. et al. Recovery and techno-functionality of flours and proteins from two edible insect species: Meal worm (*Tenebrio molitor*) and black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. **Heliyon**, v. 2, n. 12, p. e00218, 2016.
- CHAPMAN K.P. et al. Threonine requirement of parenterally fed postsurgical human neonates. **Am J Clin Nutr.** 2009
- COLOVIC M.B. et al. Sulphur-containing Amino Acids: Protective Role Against Free Radicals and Heavy Metals. **Curr Med Chem.** 30;25(3):324-335. 2018.
- CRUZ F.M. et al. "Fearing the enemy": Growth and stress biomarker responses of sexually reversed *Oreochromis niloticus* in the presence of aquatic predatory insects. **Physiol Behav.** 228:113202. 2021.
- FAO. Dietary protein quality evaluation in human nutrition Report of an FAO Expert Consultation. . Auckland: [s.n.], , 2011
- FINKE, M.D. OONINCX , D. Insetos como alimento para insetívoros . In: Produção em Massa de Organismos Benéficos , pp. 583 – 616 [Shapiro-Ilan JAM-RGRI, editor]. San Diego : Imprensa Acadêmica . ( 2014 )

- FRAQUEZA, M.J.R. COUTINHO PATARATA, L.A.S. Constraints of HACCP Application on Edible Insect for Food and Feed. *Future Foods*. [S.l.]: IntechOpen, 2017. . Disponível em: <undefined/state.item.id>. Acesso em: 11 ago. 2022.
- GÓRSKA-WARSEWICZ, Hanna et al. Food Products as Sources of Protein and Amino Acids—The Case of Poland. **Nutrients**, v. 10, n. 12, p. 1977, 2018.
- GRAVEL, A. DOYEN, A. The use of edible insect proteins in food: Challenges and issues related to their functional properties. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 59, p. 102272, 2020.
- HOLEČEK, M. Histidine in health and disease: metabolism, physiological importance, and use as a supplement. **Nutrients**, v. 12, n. 3, p. 848, 2020
- INSTITUTE OF MEDICINE. Dietary reference intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D, and fluoride. Washington (DC): National Academy Press; 1997
- INSTITUTE OF MEDICINE. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids. Washington (DC): National Academy Press; 2005
- INSTITUTE OF MEDICINE. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. Washington (DC): National Academy Press; 2002.
- KIM, T. et al. Edible insects as a protein source: A review of public perception, processing technology, and research trends. **Food science of animal resources**, v. 39, n. 4, p. 521, 2019.
- LIU H. J. et al. Determination of Amino Acids in Food and Feed by Derivatization with 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate and Reversed-Phase Liquid Chromatographic Separation, **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v.78, 3, 1995.
- MA Q. et al. Dietary supplementation with aromatic amino acids decreased triglycerides and alleviated hepatic steatosis by stimulating bile acid synthesis in mice. **Food Funct.** 12(1):267-277. 2021.
- MELGAR-LALANNE, G. et al. Edible insects processing: Traditional and innovative technologies. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, n. 4, p. 1166-1191, 2019.
- NASEEM, R. et al. Entomophagy: An innovative nutritional and economic navigational tool in race of food security. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 41, n. 3, p. 2211-2221, 2021.
- POSHADRI, A. et al. Insects as an alternate source for food to conventional food animals. **International Journal of Pure & Applied Bioscience**, v. 6, n. 2, p. 697-705, 2018.
- SARRUGE, J. R.; HAAG, H. P. Análise química de plantas. Piracicaba: ESALQ. 1974.
- SILVA-CARDOSO, L. et al. Paralytic activity of lysophosphatidylcholine from saliva of the waterbug *Belostoma anurum*. **Journal of Experimental Biology**, v. 213, n. 19, p. 3305-3310, 2010.

VALBON, W R et al. Life History Traits and Predatory Performance of *Belostoma anurum* (Hemiptera: Belostomatidae), a Biological Control Agent of Disease Vector Mosquitoes. **Neotropical entomology**, v. 121212, p. 2222225, 2019.

VAN HUIS, A. Edible insects are the future? **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 75, n. 3, p. 294-305, 2016.

VANDEWEYER, D. et al. Effect of blanching followed by refrigerated storage or industrial microwave drying on the microbial load of yellow mealworm larvae (*Tenebrio molitor*). **Food Control**, v. 71, p. 311–314, 2017.

ZIELIŃSKA, E. et al. Selected species of edible insects as a source of nutrient composition. **Food Research International**, v. 77, p. 460-466, 2015.

## 7 CONCLUSÃO GERAL

A realização da revisão sistemática possibilitou concluir que, embora os achados da literatura sejam heterogêneos quanto à qualidade da proteína de insetos, a entomofagia é potencialmente benéfica. Observando a manutenção de índices, como peso corporal, ingestão alimentar e NPR, é possível observar o potencial dos insetos comestíveis como fonte proteica.

O presente estudo desenvolveu e caracterizou farinhas de insetos comestíveis com potencial de uso na alimentação humana a partir das espécies *Tenebrio molitor*, *Gryllus assimilis* e *Belotoma anurum*. Todas as farinhas desenvolvidas foram excelentes fontes de proteína, fósforo, cobre, ferro, zinco e manganês. As farinhas atendem às recomendações de histidina, treonina, aminoácidos sulfurados e aminoácidos aromáticos, entretanto, a lisina é o aminoácido limitante em sua composição.

As farinhas de *Tenebrio molitor* e *Gryllus assimilis* foram, ainda, classificadas como fonte de potássio e niacina e suas proteínas apresentaram boa digestibilidade *in vitro* e maior solubilidade em pH alcalino. O estágio de desenvolvimento foi capaz de influenciar o conteúdo nutricional, perfil de aminoácidos e propriedades funcionais da proteína desses insetos, sendo que *Gryllus assimilis* adulto e a pupa de *Tenebrio molitor* se destacaram em relação as ninfas e larvas das respectivas espécies.

Assim, as farinhas desenvolvidas a partir de insetos possuem potencial como ingredientes para fins industriais. A adição desse tipo de farinha em produtos e preparações deve ser considerada pela indústria de alimentos com o objetivo de agregar valor nutricional e boas propriedades tecnológicas mesmos.

Em conclusão, os resultados do presente trabalho contribuem para avanços em pesquisas nesta área e podem direcionar estudos futuros no desenvolvimento de produtos a partir de insetos comestíveis. Assim, são necessários, ainda, estudos que avaliem a fundo os fatores que influenciam na qualidade da proteína de insetos, sua segurança, biodisponibilidade de minerais, bem como estudos que suportem regulamentações sobre esse tipo de alimento no Brasil.