

### CAPÍTULO 3

#### Extração de proteínas de mosca-soldado-negra (*Hermetia illucens*)

Isabela Cristine Braga de Oliveira\*<sup>1</sup>; Bruna Larissa Pestana dos Santos<sup>2</sup>; Carolina Magalhães Caires Carvalho<sup>3</sup>; Flávia Echila Ribeiro Batista<sup>4</sup>; Bruna Mara Aparecida de Carvalho Mesquita<sup>5</sup>

#### Resumo

Larvas da mosca-soldado-negra (*Hermetia illucens*) são importante fonte alternativa de proteína, pois apresentam de 35-57 % deste macronutriente, baseado na matéria seca. Neste trabalho objetivou-se extrair proteínas da *Hermetia illucens* por precipitação ácida, adição de sal e solventes orgânicos, com posterior quantificação das proteínas totais por Bradford e identificação por eletroforese. Obteve-se para a precipitação por ácido forte (método A), sal (método B) e solventes orgânicos (método C), respectivamente, 30,75; 47,52 e 28,52 mg de proteínas · g de precipitado<sup>-1</sup>. Pela eletroforese constatou-se a presença da fosforilase b (97 kDa), albumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), uma proteína com banda na faixa de 30 kDa a 20.1 kDa (proteínas da cutícula ou quimotripsina) e outra com peso molecular abaixo de 14.4 kDa, acreditando-se tratar das proteínas do tipo glutelinas. Destacou-se a presença mais fortes da banda de 66 kDa nos precipitados obtidos pelos três métodos. Observou-se uma banda nítida entre 30 kDa e 20.1 kDa no precipitado obtido pelo método A e bandas abaixo de 14.4 kDa obtida pelos métodos A e C. Todas as outras bandas de proteínas também apresentaram-se mais fortes no método A seguido do C. Utilizou-se o GelQuant.NET para análise quantitativa do método de identificação mais adequado e a precipitação por ácidos mostrou-se como a melhor opção, já que a intensidade da banda de 66 kDa foi de 57 % pelo método A, de 19 % pelo método B e de 22 % pelo método C. Para as demais bandas que estavam mais visíveis isso também foi observado. Conclui-se que é possível extrair proteínas de mosca-soldado-negra com diferentes pesos moleculares, entretanto é necessário ajustar e otimizar os parâmetros dos processos utilizados visando aumentar a variedade de macromoléculas extraídas e o rendimento de extração.

**Palavras-chave:** Insetos comestíveis. Eletroforese. Precipitação. Processos.

<sup>1</sup> Discente de graduação do curso de Engenharia de Alimentos; Instituto de Ciências Agrárias da UFMG.

<sup>2</sup> Discente de graduação do curso de Engenharia de Alimentos; Instituto de Ciências Agrárias da UFMG.

<sup>3</sup> Técnica do laboratório de Processos e Compostos Nutracêuticos e Funcionais; Instituto de Ciências Agrárias da UFMG.

<sup>4</sup> Técnica do laboratório de Biotecnologia; Instituto de Ciências Agrárias da UFMG.

<sup>5</sup> Docente do curso de Engenharia de Alimentos; Instituto de Ciências Agrárias da UFMG.

\*E-mail: bragaisabela57@gmail.com

## Introdução

As proteínas são macromoléculas formadas por aminoácidos que executam funções relevantes em diversos processos fisiológicos como estrutura, transporte, entre outros (COELHO-JUNIOR *et al.*, 2020). Dos vinte tipos de aminoácidos usados para sintetizar as proteínas humanas, nove são adquiridos apenas da dieta (MASKO; ALLOTT; FREEDLAND, 2013), todavia a proteína dietética é de fundamental importância na proteção da saúde humana.

Existem pesquisas que há tempo vêm buscando indicar o papel do consumo de proteína dietética e seu efeito na saúde (CHEN *et al.*, 2020). Dietas ricas em proteínas melhoram a pressão arterial, os níveis de triglicerídeos e a perda de peso, segundo estudos controlados randomizados (SANTESSO *et al.*, 2012; WYCHERLEY *et al.*, 2012). Porém, vários estudos disseram que uma maior ingestão de proteínas dietéticas ao longo dos anos está relacionada a um maior risco de desenvolver câncer, doenças cardiovasculares e diabetes tipo 2 (FARVID *et al.*, 2014; LAGIOU *et al.*, 2012; SHANG *et al.*, 2016). Dessa forma, é importante consumir proteínas de forma equilibrada para se trazer os benefícios esperados a saúde.

De acordo com estimativas das Nações Unidas a população mundial pode atingir 9,7 bilhões até 2050 (UNITED NATIONS, 2019). Tem aumentado as preocupações no que refere a disponibilidade dos recursos do planeta, como terras agrícolas e água doce para satisfazer as necessidades alimentares de uma população que está crescendo. Os obstáculos resultantes da mudança climática e do crescimento da população global estão promovendo a demanda por fontes alternativas de alimentos para humanos que sejam obtidos de forma mais sustentável que as fontes tradicionais de proteína e que em termos de aspectos nutricionais sejam saudáveis (FAO, 2021), sendo assim os insetos comestíveis se tornam uma alternativa viável. Como 67-98 % das proteínas dos insetos comestíveis são muito digeríveis, grande parte deles podem ser classificados como fontes de proteínas de alto valor, uma vez que apresentam aminoácidos essenciais variando de 46 a 96 % (RAMOS-ELORDUY *et al.*, 1997).

Fazendas de insetos que produzem de forma industrial necessitam de menor quantidade de água e espaço de terra quando comparados a pastagens (OONINCX; BOER, 2012) e algumas espécies podem consumir resíduos orgânicos e fluxos secundários (NADEAU *et al.*, 2015; VAN HUIS, 2013). Portanto, países em desenvolvimento que tem necessidade de investir em baixa tecnologia e capital podem trabalhar com a criação de insetos, do mesmo modo que se pode utilizar alta tecnologia e métodos automatizados objetivando produtos de qualidade e seguros (VAN HUIS *et al.*, 2013).

Os insetos são animais de grande diversidade no planeta, vivem praticamente em todos os ecossistemas terrestres e aquáticos e representam metade da biomassa animal total (HERNÁNDEZ; GONZÁLEZ; ARRIOLA, 2017). Aproximadamente 2000 espécies de insetos são apontadas como

comestíveis e essa quantidade vem aumentando, sendo que 49 % são besouros e lagartas; abelhas, vespas e formigas representam 14%; gafanhotos, locustas e grilos são 13 %; 10 % são hemípteros; 3 % são libélulas; cupins são 3 % e 2 % são moscas (ORTEGA, 2020).

Os insetos são fonte de alimento nutritiva e saudável que apresentam elevado teor de proteína, gordura, vitamina, fibra e mineral (VAN HUIS, 2020) e além dos benefícios nutricionais estes também são reconhecidos por inúmeras organizações e governos como uma forma de reprimir as mudanças climáticas, reduzindo as emissões de gases de efeito estufa, sendo vantajoso ao meio ambiente (OONINCX *et al.*, 2010).

Quando comparada a criação de gado, a criação de insetos comestíveis mostrou-se ter menor impacto ambiental (YEN, 2009), preservando melhor o meio ambiente e propiciando benefícios nutricionais. Segundo Fiala (2008), ainda que as fontes tradicionais de proteínas como o gado e os peixes por exemplo, sejam viáveis do ponto de vista econômico em razão da grande produtividade, cooperam para custos ambientais gigantescos. Metais pesados, contaminação de águas superficiais e subterrâneas com esterco podendo carregar microrganismos patogênicos e contaminantes químicos estão inclusos nestes custos (THORNE, 2007), assim como desmatamento e emissão de gases de efeito estufa e amônia, consequência do aumento das necessidades de alimentação (VAN HUIS, 2015).

A mosca-soldado-negra (*Hermetia illucens*) é proveniente da América, porém na atualidade pode ser encontrada em regiões tropicais, subtropicais ou temperadas. Um dos motivos que justificam o interesse nessa espécie são pelo fato que as moscas adultas não necessitam de alimentação, não mordem e nem picam e conseqüentemente não são vetores de doenças (LALANDER *et al.*, 2019; WANG; SHELOMI, 2017).

A mosca-soldado-negra fêmea deposita em torno de 500 ovos na matéria orgânica e depois de 4 dias os ovos eclodem e por volta de 14 dias rapidamente as larvas consomem a matéria orgânica que está ao seu redor. Durante esses 14 dias as larvas passam por seis instares de desenvolvimento antes de se transformarem em pupa (DICLARO; KAUFMAN, 2009). Quando as larvas da mosca-soldado-negra estão prontas para se transformar em pupas, rastejam para fora de sua alimentação, colhendo a si mesmas, proporcionando menos trabalho manual e diminuindo o custo de sua agricultura (WANG; SHELOMI, 2017).

As larvas da mosca-soldado-negra são insetos pequenos e inofensivos, sendo apropriados para a produção em massa e para diversas aplicações agrícolas e industriais. Em razão de não serem exigentes quando se refere a substrato de criação e taxa de conversão alimentar eficiente, são capazes de descartar de forma eficiente uma grande diversidade de resíduos orgânicos, transformando-os em uma biomassa rica em proteínas e gorduras (GOLD *et al.*, 2018). As larvas apresentam proteínas e gordura com base na matéria seca que pode variar de 35 a 57% e de 15 a 49%, respectivamente, conforme as condições

de criação (BARRY, 2004; DORDEVIC *et al.*, 2008; FINKE, 2002; GUTIÉRREZ; RUIZ; VÉLEZ, 2004; NEWTON *et al.*, 2005), sendo as proteínas os componentes nutricionais presentes em maior quantidade. No decorrer do estágio larval a composição nutricional se modifica, de forma que o teor de proteína diminui com a idade e o teor de gordura aumenta (LIU *et al.*, 2017; RACHMAWATI *et al.*, 2015).

Os mecanismos de extração, portanto, se tornam cruciais para que seja possível extrair proteínas a partir de métodos rápidos, simples e eficazes, preservando as características dessas macromoléculas, garantindo qualidade, alto rendimento e variedade de tipos de proteínas a fim das mesmas serem empregadas na indústria alimentícia para enriquecimento de vários alimentos, assim como para propiciar benefícios tecnológicos aos mesmos. Teve-se como objetivo extrair proteínas da *Hermetia illucens* através da precipitação por ácido forte, por adição de sal e por solventes orgânicos e posteriormente identificá-las por eletroforese.

## Material e Métodos

Amostras de larvas de mosca-soldado-negra (Figura1), cultivadas na fazenda experimental do Instituto de Ciências Agrárias da UFMG, alimentadas com farelo de milho até o 25º dia de desenvolvimento que passaram por período de 24h de jejum antes de serem abatidas por congelamento em freezer a -20 °C, foram empregadas para a obtenção da biomassa utilizada no presente trabalho. Para tal obtenção, as larvas congeladas foram trituradas no Mixer (Arno Turbomix Duo MX2, 200W), usando-se nitrogênio líquido para facilitar o processo, em seguida adicionou-se água aos insetos triturados, colocou-se no Sonicador (modelo Q3350, 110/220 V - 70 W), filtrou-se no pano voal e a parte retida no pano (biomassa) foi armazenada a -4 °C para ser utilizada em análises posteriores.

Realizou-se três tipos de precipitação, por ácido forte, por adição de sal e por solventes orgânicos.

A precipitação por ácido forte foi realizada conforme o método descrito por Benabdelkamel *et al.* (2018), com algumas modificações. Ácido tricloroacético 10% foi adicionado a biomassa de inseto na proporção de 1:4 v/v e a mistura foi mantida a 4 °C *overnight*. Logo após a solução foi centrifugada a 16000 g por 10 minutos a 4 °C e o precipitado resultante foi misturado a 1 mL de acetona gelada a -20 °C, seguidamente centrifugou-se a 16000 g por 10 minutos a 4 °C e novamente esse processo foi repetido. O precipitado formado foi filtrado no pano voal e posteriormente aquecido a 98 °C em chapa de aquecimento durante 1 minuto para remoção de qualquer vestígio de ácido tricloroacético.

Figura 1: Larvas da mosca-soldado-negra (*Hermetia illucens*) utilizadas no experimento



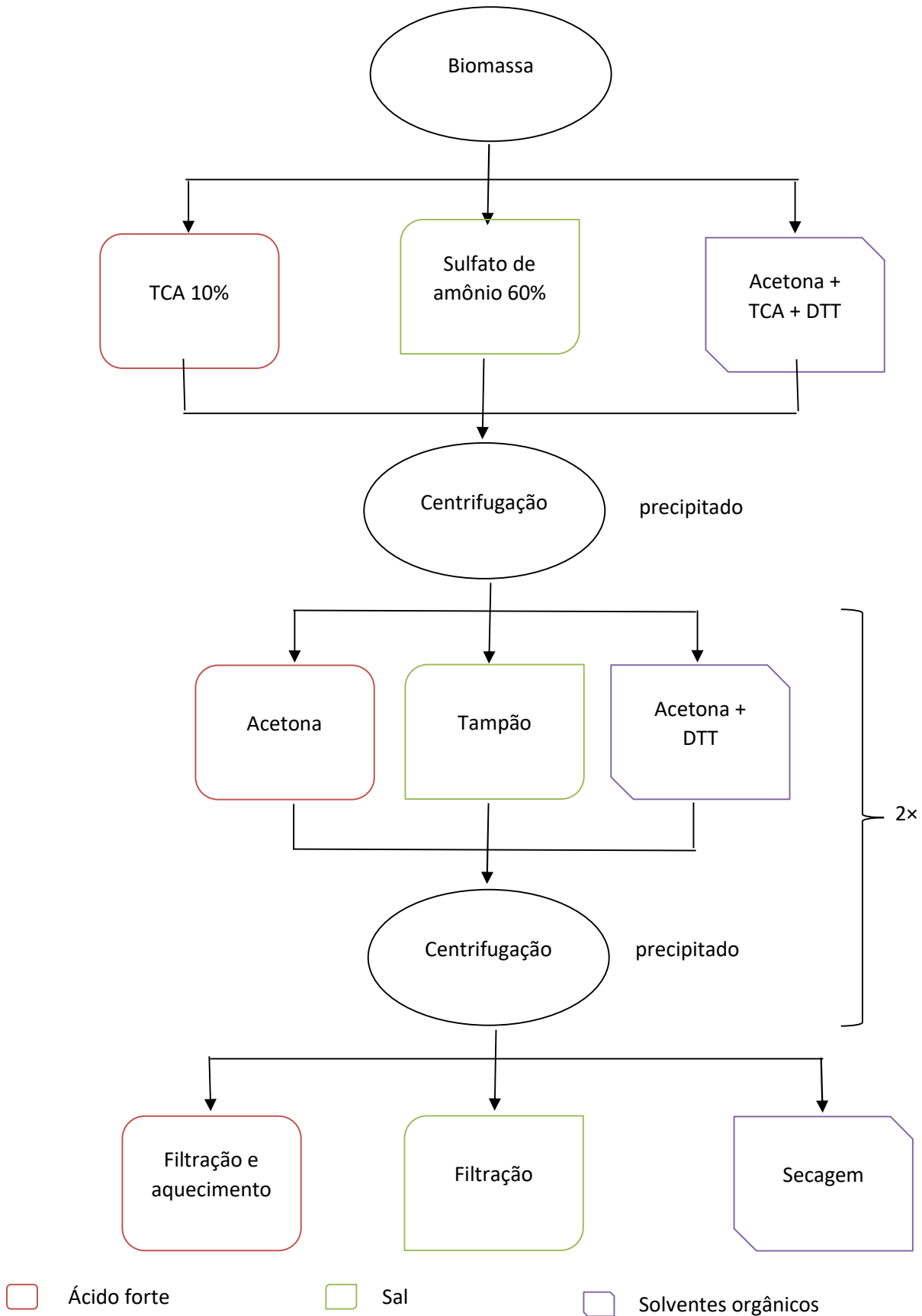
Fonte: Do autor, 2023.

A precipitação por adição de sal foi feita de acordo com o método relatado por Zhang *et al.* (2017), com algumas modificações. Primeiramente, 1 volume de biomassa de inseto foi misturada com 1 volume de solução 60 % de sulfato de amônio saturado em gelo. Em seguida a solução foi mantida em modo repouso por 1 h a 4 °C e centrifugada a 8000 g por 30 minutos a 4 °C. O precipitado resultante foi misturado com tampão fosfato de sódio 50 mM (pH7) e depois centrifugada a 8000 g por 30 minutos a 4 °C, sendo esse processo repetido novamente, porém com velocidade de centrifugação de 10000 g. O precipitado resultante foi colocado em água e filtrado com o pano voal.

A precipitação por solventes orgânicos foi executada segundo Daim *et al.* (2015), com algumas modificações. A princípio a biomassa de inseto e a solução de acetona fria a -20 °C (contendo 20 % de ácido tricloroacético e 0,2 % de ditiotreitól) foram misturadas na proporção de 1:2 p/v. Logo após foi deixada em *overnight* e centrifugada a 10000 g em 4 °C por 30 minutos. O precipitado resultante foi misturado em solução de acetona fria (contendo 0,2 % de ditiotrietól) e colocado no freezer por 1 h a -20 °C, com posterior centrifugação a 10000 g a 4 °C por 10 minutos. Esse processo descrito anteriormente foi repetido e o precipitado obtido foi seco ao ar.

O fluxograma a seguir (Figura 2) explica os três tipos de precipitação.

Figura 2 - Fluxograma dos três tipos de precipitação



Fonte: Dos autores, 2023.

Legenda: TCA (Ácido tricloroacético), DTT (Ditiotreitol).

## Resultados e Discussão

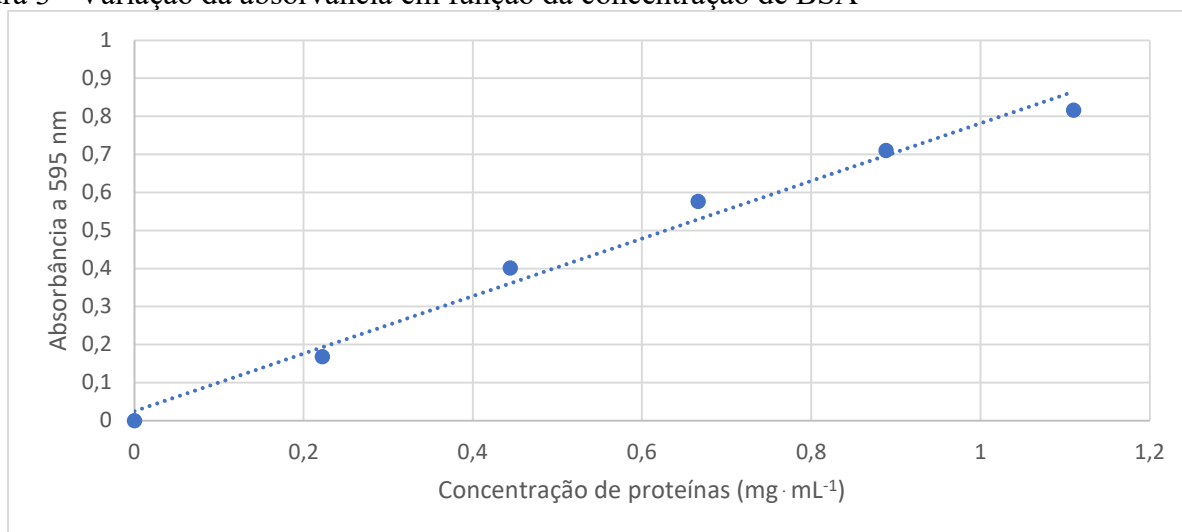
A quantificação de proteínas das frações obtidas dos precipitados foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando-se albumina de soro bovino, BSA (Sigma, EUA), como proteína de referência. Para tal, a partir dos dados obtidos nas leituras espectrais (Tabela 1) da BSA e suas respectivas concentrações à 595nm em Espectrofotômetro (Shimadzu, Japão), construiu-se uma curva de calibração da referida proteína (Figura 3).

Tabela 1 - Concentração e valores médios de absorvância das soluções para a curva padrão de BSA

Concentração ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Absorvância (595 nm)
0	0
0,222	0,168
0,444	0,401
0,666	0,576
0,888	0,710
1,110	0,816

Fonte: Dos autores, 2023.

Figura 3 - Variação da absorvância em função da concentração de BSA



Fonte: Dos autores, 2023.

A partir dos dados alcançados obteve-se a equação linear  $y = 0,7569x + 0,0251$ , com coeficiente de determinação 0,9848; em que y é a absorvância da solução e x é a concentração da proteína presente na mesma ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

As frações proteicas obtidas das etapas de precipitações foram, também, identificadas e comparadas com padrões de proteínas, por eletroforese SDS-PAGE no equipamento Loccus (modelo

VERT-i10), em gel de poliacrilamida na concentração de 12 % de acordo com a metodologia descrita por Queiroz *et al.* (2021). Todas as amostras foram tratadas com tampões contendo SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol. As amostras foram aquecidas a 100°C por 10 minutos. Alíquotas de 10 a 15  $\mu$ L de cada amostra foram aplicadas ao gel que foi submetido a uma voltagem de 150V, em cuba horizontal e colorido com azul de cromassie.

A biomassa obtida possui características como coloração amarronzada e é densa (Figura 4) e foi considerada apropriada para análises posteriores.

Figura 4 - Biomassa obtida da mosca-soldado-negra (*Hermetia illucens*)



Fonte: Dos autores, 2023.

Em relação ao teor total de proteínas dos precipitados, mediu-se a absorvância da biomassa de inseto pura e obteve-se média de 0,717. Posteriormente se aplicou na equação linear citada acima e obteve-se concentração de proteínas de 0,914 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>.

Mediu-se a absorvância do sobrenadante resultante de cada tipo de precipitação, obtendo-se valores médios de absorvância de 0,192; 0,059 e 0,268 para a precipitação por ácido forte (método A), por adição de sal (método B) e por solventes orgânicos (método C), respectivamente.

O volume da solução final e a massa de precipitado foram 62,5 mL e 1,4087 g; 100 mL e 1,8181 g e 150 mL e 3,1192 g, para os métodos A, B e C, respectivamente. Por diferença foi possível quantificar as proteínas presentes no precipitado, na qual a concentração de proteínas ( $q$ ) foi determinada através da Equação 1.

$$q = \frac{V}{m}(C_0 - C_b) \quad (\text{Eq. 1})$$

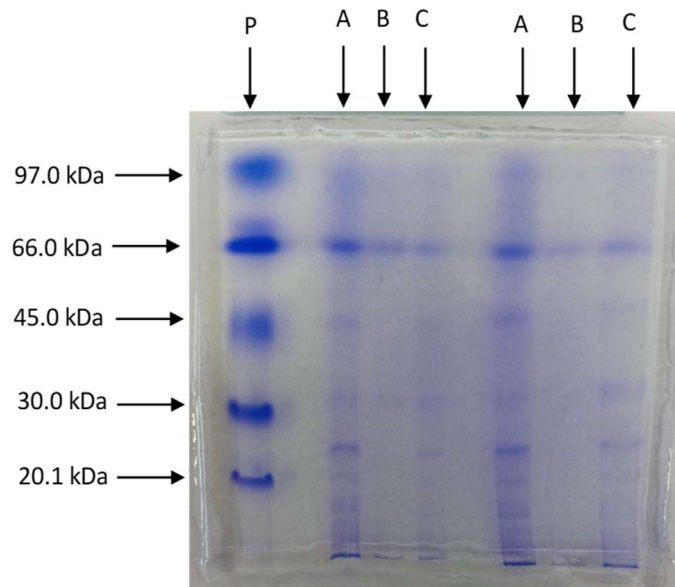
onde V é o volume da solução final (mL), m é a massa de precipitado (g), C<sub>0</sub> é a concentração de

proteína inicial ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e  $C_b$  é a concentração da proteína em suspensão no sobrenadante ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

Na precipitação por ácido forte obteve-se  $30,75 \text{ mg}$  de proteínas  $\cdot \text{g}$  de precipitado<sup>-1</sup>; na precipitação por adição de sal obteve-se  $47,52 \text{ mg}$  de proteínas  $\cdot \text{g}$  de precipitado<sup>-1</sup> e na precipitação por solventes orgânicos obteve-se  $28,52 \text{ mg}$  de proteínas  $\cdot \text{g}$  de precipitado<sup>-1</sup>.

As proteínas foram identificadas pela eletroforese em gel de poliácridamida com dodecil- sulfato de sódio (SDS-PAGE) como mostrado na Figura 5 e constatou-se a presença de fosforilase b (97 kDa), albumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), uma proteína com banda na faixa de 30 kDa a 20.1 kDa, que poderia se originar de proteínas da cutícula apresentando peso molecular com predominância entre 14 e 30 kDa (Andersen *et al.*, 1995) ou proteinase semelhante a quimotripsina (24 kDa) (Elpidina *et al.*, 2005) e outra com peso molecular abaixo de 14.4 kDa, acreditando-se tratar das proteínas do tipo glutelinas, conforme dito por Queiroz *et al.* (2021).

Figura 5 - Gel de eletroforese



Fonte: Dos autores, 2023.

Legenda: P (proteínas padrão), A (método de precipitação por ácido forte), B (método de precipitação por sal) e C (método de precipitação por solventes orgânicos).

Destacou-se a presença mais forte da banda de 66 kDa nos precipitados obtidos pelos três métodos de precipitação. Observou-se uma banda nítida entre 30 kDa e 20.1 kDa no precipitado obtido pelo método A e bandas abaixo de 14.4 kDa obtida pelos métodos A e C. Todas as outras bandas de proteínas também se apresentaram mais fortes no método A seguido do C. Utilizou-se o GelQuant.NET para análise quantitativa do método de identificação mais adequado, de forma que a precipitação por ácido forte mostrou-se como a melhor opção, já que a intensidade da banda de 66 kDa foi de 57 % pelo

método A, de 19 % pelo método B e de 22 % pelo método C. Para as demais bandas que estavam mais visíveis isso também foi observado.

De acordo com os resultados da pesquisa feita por Michyna *et al.* (2019) na qual foi realizada a extração alcalina seguida por precipitação ácida da abelha melífera (*Apis melífera*) e dos gafanhotos comestíveis (*Schistocerca gregária*), obteve-se bandas de proteínas com peso molecular de 75 a 200 kDa da *Apis melífera* e bandas com peso molecular < 20 kDa da *Schistocerca gregária*, essas semelhantes a  $\alpha$ -lactoalbumina (14,2 kDa) e  $\beta$ -lactoalbumina (18,4 kDa). Isso comprova a predominância de proteínas de baixo peso molecular presentes em diferentes espécies de insetos comestíveis.

Segundo os resultados do estudo de Bubler *et al.* (2016) na qual foi feita a extração aquosa em pH ajustado para 10 da farinha desengordurada de *Tenebrio Molitor* seguida da precipitação ácida, obteve-se uma fração com alta quantidade de proteína verificando-se bandas entre 14 e 32 kDa que possivelmente se originaram de proteínas da cutícula (pesos moleculares em sua maioria entre 14 e 30 kDa) ou da proteinase semelhante a quimotripsina (24 kDa), evidenciando também a analogia com as proteínas identificadas na mosca-soldado-negra.

Conforme os resultados apresentados na pesquisa realizada por Yi *et al.* (2013) que foi realizada a extração utilizando água desmineralizada e ácido ascórbico e obteve-se um precipitado com teor de proteína variando de 65 a 75 %, sendo o maior em relação as demais frações obtidas, demonstra a alta quantidade de proteínas presentes nos insetos comestíveis.

Segundo os resultados adquiridos no estudo de Amarender *et al.* (2020) na qual se utilizou NaOH e ácido ascórbico para extração de proteínas de pó de grilo (*Gryllidae*), também foi observado um aumento no teor de proteínas extraídas utilizando o ácido, resultando em 69,69 % e 61,75 % usando NaOH, provando que os rendimentos de proteína foram maiores na região ácida, assim como observado na extração por precipitação ácida realizada no presente experimento na qual essa se mostrou como um método eficaz.

## Conclusão

Conclui-se que os insetos comestíveis, principalmente a mosca-soldado-negra, são uma fonte alternativa de proteína sustentável para abastecer a população mundial, na qual foi possível extrair proteínas a partir da precipitação que é um método rápido e simples. Através dos três métodos de precipitação conseguiu-se extrair proteínas de diferentes pesos moleculares. Porém é necessário ajustar e otimizar os parâmetros dos processos realizados a fim de aumentar a variedade de macromoléculas extraídas e o rendimento de extração. Além disso, são necessárias pesquisas futuras explorando as

características das proteínas presentes nesses insetos, para dessa forma utilizar métodos adequados para recuperação das mesmas.

## Agradecimentos

A FAPEMIG pelo apoio financeiro no projeto e ao CNPq pela concessão da bolsa de iniciação científica.

## Referências

AMARENDER, R. V. et al. Lipid and protein extraction from edible insects – Crickets (Gryllidae). **LWT**, v. 125, p. 109222, maio 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109222>>. Acesso em: 23. Jun. 2023.

SVEND OLAV ANDERSEN et al. Comparison of larval and pupal cuticular proteins in *Tenebrio molitor*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 25, n. 2, p. 177–187, 1 fev. 1995. Disponível em: <[10.1016/0965-1748\(94\)00048-m](https://doi.org/10.1016/0965-1748(94)00048-m)>. Acesso em: 23. Jun. 2023.

BARRY, T. **Evaluation of the economic, social, and biological feasibility of bioconverting food wastes with the black soldier fly (*Hermetia illucens*)**. 2004. 176f. Tese de Doutorado (Ciência Ambiental) – Universidade do Norte do Texas, Denton, 2004. Disponível em: <<https://digital.library.unt.edu/ark:/67531/metadc4639/>>. Acesso em: 23. Jun. 2023.

BENABDELKAMEL, H. et al. Comparison of protein precipitation methods from adipose tissue using difference gel electrophoresis. **ELECTROPHORESIS**, v. 39, n. 14, p. 1745–1753, 4 jun. 2018. Disponível em: <[10.1002/elps.201800124](https://doi.org/10.1002/elps.201800124)>. Acesso em: 23. Jun. 2023.

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, dez. 2016. Disponível em: <[10.1016/j.heliyon.2016.e00218](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2016.e00218)>. Acesso em: 23. Jun. 2023.

CHEN, Z. et al. Dietary protein intake and all-cause and cause-specific mortality: results from the Rotterdam Study and a meta-analysis of prospective cohort studies. **European Journal of Epidemiology**, v. 35, n. 5, p. 411–429, 19 fev. 2020. Disponível em: <[10.1007/s10654-020-00607-6](https://doi.org/10.1007/s10654-020-00607-6)>. Acesso em: 23. Jun. 2023.

COELHO-JUNIOR, H. J. et al. Protein Intake and Frailty: A Matter of Quantity, Quality, and Timing. **Nutrients**, v. 12, n. 10, p. 2915, 23 set. 2020. Disponível em: <[10.3390/nu12102915](https://doi.org/10.3390/nu12102915)>. Acesso em: 23. Jun. 2023.

DAIM, L. D. J. et al. Optimization of Protein Extraction and Two-Dimensional Electrophoresis Protocols for Oil Palm Leaf. **The Protein Journal**, v. 34, n. 4, p. 304–312, ago. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10930-015-9626-x>>. Acesso em: 23. Jun. 2023.

DICLARO II, J. W.; KAUFMAN, P. E. Black soldier fly *Hermetia illucens* Linnaeus (Insecta: Diptera: Stratiomyidae). **EDIS**, v. 2009, n. 7, 31 ago. 2009. Disponível em: <10.32473/edis-in830-2009>. Acesso em: 23. Jun. 2023.

MILUTIN ĐORĐEVIĆ *et al.* Effects of substitution of fish meal with fresh and dehydrated larvae of the house fly (*Musca domestica* L) on productive performance and health of broilers. **Acta Veterinaria-beograd**, v. 58, n. 4, p. 357–368, 1 jan. 2008. Disponível em: <10.2298/AVB0804357D>. Acesso em: 23. Jun. 2023.

ELPIDINA, E. *et al.* A chymotrypsin-like proteinase from the midgut of larvae. **Biochimie**, v. 87, n. 8, p. 771–779, ago. 2005. Disponível em: <10.1016/j.biochi.2005.02.013>. Acesso em: 23. Jun. 2023.

FAO. Looking at edible insects from a food safety perspective: challenges and opportunities for the sector. Roma: FAO, 2021. Disponível em: <<https://www.fao.org/documents/card/en/c/cb4094en>>. Acesso em: 3 abr. 2023.

FARVID, M. S. *et al.* Dietary protein sources in early adulthood and breast cancer incidence: prospective cohort study. **BMJ**, v. 348, n. jun10 3, p. g3437–g3437, 10 jun. 2014. Disponível em: <10.1136/bmj.g3437>. Acesso em: 3 abr. 2023.

FIALA, N. Meeting the demand: An estimation of potential future greenhouse gas emissions from meat production. **Ecological Economics**, v. 67, n. 3, p. 412–419, out. 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2007.12.021>>. Acesso em: 3 abr. 2023.

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. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/zoo.10031>>. Acesso em: 3 abr. 2023.

GOLD, M. *et al.* Decomposition of biowaste macronutrients, microbes, and chemicals in black soldier fly larval treatment: A review. **Waste Management**, v. 82, p. 302–318, dez. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.10.022>>. Acesso em: 3 abr. 2023.

GUTIÉRREZ, G.P.A.; RUIZ, R.A.V.; VÉLEZ, H.M. Compositional, microbiological and protein digestibility analysis of larval meal of *Hermetia illucens* (Diptera:Stratiomyiidae) at Angelópolis-Antioquia, Colombia. **Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín**, v.57, n.2, p. 2491–2499, 2004. Disponível em: <[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0304-28472004000200009&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-28472004000200009&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 3 abr. 2023.

HERNANDEZ, N.G; GONZÁLEZ, S.R.; ARRIOLA, A. Hambre oculta. **Acta Pediátrica Hondureña**, v.8, n.1, p. 739–750, 2019. Disponível em: <<https://eucs.unah.edu.hn/revistas/acta-pediatrica-hondurena/publicaciones-aph-2/>>. Acesso em: 3 abr. 2023.

LAGIOU, P. *et al.* Low carbohydrate-high protein diet and incidence of cardiovascular diseases in Swedish women: prospective cohort study. **BMJ**, v. 344, n. jun26 3, p. e4026–e4026, 26 jun. 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1136/bmj.e4026>>. Acesso em: 3 abr. 2023.

LALANDER, C. *et al.* Effects of feedstock on larval development and process efficiency in waste treatment with black soldier fly (*Hermetia illucens*). **Journal of Cleaner Production**, v. 208, p. 211–219, jan. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.10.017>>. Acesso em: 3 abr. 2023.

LIU, X. *et al.* Dynamic changes of nutrient composition throughout the entire life cycle of black soldier fly. **PLOS ONE**, v. 12, n. 8, p. e0182601, 10 ago. 2017. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182601>>. Acesso em: 3 abr. 2023.

MASKO, E. M.; ALLOTT, E. H.; FREEDLAND, S. J. The Relationship Between Nutrition and Prostate Cancer: Is More Always Better? **European Urology**, v. 63, n. 5, p. 810–820, maio 2013. Disponível em: < [10.1016/j.eururo.2012.11.012](https://doi.org/10.1016/j.eururo.2012.11.012)>. Acesso em: 3 abr. 2023.

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, fev. 2019. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.098>>. Acesso em: 3 abr. 2023.

NADEAU, L. *et al.* The Potential for Entomophagy to Address Undernutrition. **Ecology of Food and Nutrition**, v. 54, n. 3, p. 200–208, 17 nov. 2014. Disponível em: < [10.1080/03670244.2014.930032](https://doi.org/10.1080/03670244.2014.930032)>. Acesso em: 3 abr. 2023.

NEWTON, L. *et al.* Using the black soldier fly, *Hermetia illucens*, as a value-added tool for the management of swine manure. Report for Mike Williams, Director of the Animal and Poultry Waste Management Centre, North Carolina State University, Raleigh, NC, USA. 2005.

OONINCX, D. G. A. B.; DE BOER, I. J. M. Environmental Impact of the Production of Mealworms as a Protein Source for Humans – A Life Cycle Assessment. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. e51145, 19 dez. 2012. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051145>>. Acesso em: 3 abr. 2023.

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. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014445>>. Acesso em: 3 abr. 2023.

ORTEGA, L.P. **Seguridad alimentaria y calidad nutricional del uso de insectos en la dieta**. 2020.49f. Trabalho de conclusão de curso - Universidade Politécnica de Valencia, Valencia, 2023. Disponível em: < <http://hdl.handle.net/10251/147898>>. Acesso em: 15 out. 2023.

QUEIROZ, L. S. *et al.* Physico-chemical and colloidal properties of protein extracted from black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 186, p. 714–723, set. 2021. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.081>>. Acesso em: 3 abr. 2023.

RACHMAWATI, R. *et al.* Perkembangan dan Kandungan Nutrisi Larva *Hermetia illucens* (Linnaeus) (Diptera: Stratiomyidae) pada Bungkil Kelapa Sawit. **Jurnal Entomologi Indonesia**, v. 7, n. 1, p. 28, 28 set. 2015. Disponível em: < <https://doi.org/10.5994/jei.7.1.28>>. Acesso em: 15 out. 2023.

RAMOS-ELORDUY, J. *et al.* Nutritional Value of Edible Insects from the State of Oaxaca, Mexico. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 10, n. 2, p. 142–157, jun. 1997. Disponível em: < <https://doi.org/10.1006/jfca.1997.0530>>. Acesso em: 15 out. 2023.

SANTESSO, N. *et al.* Effects of higher- versus lower-protein diets on health outcomes: a systematic review and meta-analysis. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 66, n. 7, p. 780–788, 18 abr. 2012. Disponível em: < [10.1038/ejcn.2012.37](https://doi.org/10.1038/ejcn.2012.37)>. Acesso em: 15 out. 2023.

SHANG, X. *et al.* Dietary protein intake and risk of type 2 diabetes: results from the Melbourne Collaborative Cohort Study and a meta-analysis of prospective studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 104, n. 5, p. 1352–1365, 14 set. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.3945/ajcn.116.140954>>. Acesso em: 15 out. 2023.

THORNE, P. S. Environmental Health Impacts of Concentrated Animal Feeding Operations: Anticipating Hazards—Searching for Solutions. **Environmental Health Perspectives**, v. 115, n. 2, p. 296–297, fev. 2007. Disponível em: <10.1289/ehp.8831>. Acesso em: 15 out. 2023.

UNITED NATIONS. **World population prospects 2019**. [s.l.] United Nations, 2019. Disponível em: <[https://population.un.org/wpp/Publications/Files/WPP2019\\_Highlights.pdf](https://population.un.org/wpp/Publications/Files/WPP2019_Highlights.pdf)>. Acesso em: 15 out. 2023.

VAN HUIS, A. Edible insects contributing to food security? **Agriculture & Food Security**, v. 4, n. 1, dez. 2015. Disponível em: <<https://agricultureandfoodsecurity.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40066-015-0041-5>>. Acesso em: 15 out. 2023.

VAN HUIS, A. Nutrition and health of edible insects. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 23, n. 3, p. 228–231, maio 2020. Disponível em: <10.1097/MCO.0000000000000641>. Acesso em: 15 out. 2023.

VAN HUIS, A. Potential of Insects as Food and Feed in Assuring Food Security. **Annual Review of Entomology**, v. 58, n. 1, p. 563–583, 7 jan. 2013. Disponível em: <10.1146/annurev-ento-120811-153704>. Acesso em: 15 out. 2023.

WANG, Y.-S.; SHELOMI, M. Review of Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) as Animal Feed and Human Food. **Foods**, v. 6, n. 10, p. 91, 18 out. 2017. Disponível em: <10.3390/foods6100091>. Acesso em: 15 out. 2023.

WYCHERLEY, T. P. *et al.* Effects of energy-restricted high-protein, low-fat compared with standard-protein, low-fat diets: a meta-analysis of randomized controlled trials. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 96, n. 6, p. 1281–1298, 24 out. 2012. Disponível em: <10.3945/ajcn.112.044321>. Acesso em: 15 out. 2023.

YEN, A. L. Edible insects: Traditional knowledge or western phobia? **Entomological Research**, v. 39, n. 5, p. 289–298, set. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1748-5967.2009.00239.x>>. Acesso em: 15 out. 2023.

YI, L. *et al.* Extraction and characterisation of protein fractions from five insect species. **Food Chemistry**, v. 141, n. 4, p. 3341–3348, dez. 2013. Disponível em: <10.1016/j.foodchem.2013.05.115>. Acesso em: 15 out. 2023.

ZHANG, D. *et al.* Comparative study of potato protein concentrates extracted using ammonium sulfate and isoelectric precipitation. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 9, p. 2113–2127, 19 jan. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1230873>>. Acesso em: 15 out. 2023.