

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Haléxya Rodrigues Bavosa Pedais

Hipoclorito de sódio e fervura melhoram a qualidade microbiológica e de armazenamento das larvas de mosca-soldado-negra (*Hermetia illucens* L.)  
Diptera: Stratiomyidae

Montes Claros – MG  
2023

Haléxya Rodrigues Bavosa Pedais

Hipoclorito de sódio e fervura melhoram a qualidade microbiológica e de armazenamento das larvas de mosca-soldado-negra (*Hermetia illucens* L.) Diptera: Stratiomyidae

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Saúde.

**Área de concentração:** Alimentos e Saúde

**Orientador:** Diego Vicente da Costa

**Coorientadora:** Roberta Torres Careli

Montes Claros – MG  
2023

Pedais, Haléxya Rodrigues Bavosa.

P371h  
2023

Hipoclorito de sódio e fervura melhoram a qualidade microbiológica e de armazenamento das larvas de mosca-soldado-negra (*Hermetia illucens* L.) Diptera: Stratiomyidae [manuscrito] / Haléxya Rodrigues Bavosa Pedais. Montes Claros, 2023. 62 f.: il.

Dissertação (mestrado) - Área de concentração em Alimentos e Saúde. Universidade Federal de Minas Gerais / Instituto de Ciências Agrárias.

Orientador(a): Diego Vicente da Costa.

Banca examinadora: Diego Vicente da Costa, Roberta Torres Careli, Júlio César dos Santos Nascimento, Caroline Liboreiro Paiva.

Inclui referências: f. 46-51; 53-62.

1. Insetos comestíveis. 2. Microbiologia. 3. Embalagens. I. Costa, Diego Vicente da. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 579

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitora: Sandra Regina Goulart Almeida

Vice-Reitor: Alessandro Fernandes Moreira

Pró-Reitor de Pesquisa: Fernando Marcos dos Reis

Pró-Reitora de Pós-Graduação: Isabela Almeida Pordeus

CURSO DE MESTRADO EM ALIMENTOS E SAÚDE

Coordenador: Sérgio Henrique Sousa Santos

Subcoordenador: Igor Viana Brandi



Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Agrárias  
Curso de Mestrado em Alimentos e Saúde

## ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos 19 dia do mês de setembro de 2023, às 14:00 horas, sob a Presidência do Prof. Diego Vicente da Costa, Dr. Sc. (Orientador – UFMG/ICA) e com a participação dos Professores Roberta Torres Careli, Dr. Sc. (Coorientadora – UFMG/ICA), Júlio César dos Santos Nascimento, Dr. Sc. (Universidade Federal Rural de Pernambuco) e Caroline Liboreiro Paiva, Dr. Sc. (UFMG/ICA), reuniu-se, por videoconferência, a Banca de defesa de dissertação da Discente **Haléxya Rodrigues Bavosa Pedais**, aluna do Curso de Mestrado em Alimentos e Saúde. O resultado da defesa de dissertação intitulada: “**Hipoclorito de sódio e fervura melhoram a qualidade microbiológica e de armazenamento das larvas de mosca-soldado-negra (*Hermetia illucens L.*) Diptera: Stratiomyidae**”, sendo a aluna considerada APROVADA. E, para constar, eu, Professor Diego Vicente da Costa, Presidente da Banca, lavrei a presente ata que depois de lida e aprovada, será assinada por mim e pelos demais membros da Banca examinadora.

**OBS.: A aluna somente receberá o título após cumprir as exigências onde a candidata deverá, após a aprovação de sua Dissertação ou Tese e da realização das modificações propostas pela banca examinadora, se houver, encaminhar à secretaria do Colegiado do Programa, com a anuência do orientador, no mínimo 1 (um) exemplar impresso e 1 (um) exemplar eletrônico da dissertação no prazo máximo de 30 (trinta) dias.**

Montes Claros, 19 de setembro de 2023.

DIEGO VICENTE DA  
COSTA:35478966819

Assinado de forma digital por  
DIEGO VICENTE DA  
COSTA:35478966819  
Dados: 2023.09.19 16:41:22 -03'00'

Diego Vicente da Costa  
Orientador



Documento assinado digitalmente  
ROBERTA TORRES CARELI  
Data: 19/09/2023 20:39:38-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Roberta Torres Careli  
Coorientadora

Júlio César dos Santos Nascimento  
Membro



Documento assinado digitalmente  
JULIO CEZAR DOS SANTOS NASCIMENTO  
Data: 19/09/2023 16:43:23-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>



Documento assinado digitalmente  
CAROLINE LIBOREIRO PAIVA  
Data: 19/09/2023 18:21:39-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Caroline Liboreiro Paiva  
Membro

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me encorajar nos momentos difíceis, por me conceder o discernimento nas horas necessárias e conduzir os acontecimentos da melhor forma.

Aos meus avós (Edilene e Divino), minhas quatro mães (Janaina, Janilde, Cláudia e Janete), Rafa, Biel e Marcelo. Vocês são meus pilares e fonte inesgotável de amor, apoio e incentivo. Agradeço principalmente pelas orações constantes que emanaram de seus corações.

Ao meu marido Thiago, por todo amor, paciência, compreensão e encorajamento que foram fundamentais para que eu persistisse mesmo nos momentos mais difíceis.

À Méia e Edmar pelas orações e apoio.

À Meire e Telminha que carinhosamente moveram orações em prol do sucesso desse trabalho.

Ao meu orientador Diego, por me guiar durante essa trajetória. Obrigada, especialmente, por acreditar e confiar no meu potencial.

À minha coorientadora Roberta, por toda a assistência e por todo o conhecimento transmitido.

Ao professor Felipe, por indicar os melhores caminhos para a realização das análises estatísticas e pela valiosa contribuição nessa etapa do trabalho.

À Carol, pelo suporte técnico durante a realização dos experimentos.

À empresa Protin Biotech que gentilmente forneceu as pupas de BSF e à Isabela que intermediou todo o processo.

Ao Sandro, pelos conselhos e por todo conhecimento técnico compartilhado.

À banca avaliadora pelo tempo dedicado às correções e valiosas contribuições para a excelência desse trabalho.

À Thaís, Cinthya, Valdo e Kathuce pela colaboração prestada e por se mostrarem sempre solícitos.

À UFMG pela infraestrutura e pela oportunidade de realização do Mestrado em Alimentos e Saúde.

À FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, estiveram presentes nessa jornada, e que de alguma forma, apoiaram e encorajaram meu crescimento acadêmico, profissional e pessoal.

## RESUMO

Os insetos alimentícios representam uma opção nutritiva e sustentável para atender às demandas de nutrição humana e animal. Para assegurar que esses produtos cheguem ao mercado com excelência microbiológica até o final de sua validade, é essencial detectar e mitigar possíveis contaminantes durante todo o processo de produção e armazenamento. Nesse sentido, o presente estudo avaliou o efeito do hipoclorito de sódio (HPC) e da fervura (FEV), aplicados isoladamente ou em sequência na qualidade microbiológica e de armazenamento de larvas de mosca-soldado-negra (*Hermetia illucens*, BSF), uma das espécies mais prósperas para produção em larga escala. Para isso, um experimento fatorial 2x2 foi conduzido, utilizando os fatores HPC e FEV aplicados nos níveis de presença e ausência. Foram realizadas análises quantitativas de microrganismos indicadores de qualidade e deterioração (mesófilos aeróbios totais, Enterobacteriaceae, fungos filamentosos e leveduras). Posteriormente, verificou-se o efeito do armazenamento em temperatura ambiente ( $\pm 25,4^{\circ}\text{C}$ ) e refrigerada ( $\pm 5,2^{\circ}\text{C}$ ) sob os mesmos parâmetros. Observou-se que apenas a aplicação de HPC seguido de FEV resultou em contagens significativamente reduzidas para todos os microrganismos avaliados, quando comparadas às amostras que não receberam nenhum dos dois procedimentos ( $p < 0,05$ ). As reduções variaram de 1,86 a 3,89 log UFC/g. Ao submeter as larvas de BSF a esse procedimento sequencial e armazená-las à temperatura ambiente por 28 dias, observou-se que todos os parâmetros microbiológicos analisados se mantiveram estáveis e sem alterações significativas ( $p > 0,05$ ). Em contrapartida, houve um acréscimo de 1,78 log UFC/g ( $p < 0,05$ ) na população de mesófilos aeróbios totais transcorrido o tempo de armazenamento refrigerado. Logo, sob tais condições, esse tipo de armazenamento não pode ser recomendado visto que não foi capaz de retardar a deterioração microbiológica. Ainda que sejam necessárias análises nutricionais e químicas, os resultados abrem perspectivas para a viabilidade de armazenamento e transporte de larvas de BSF submetidas a HPC e FEV em sequência sem a necessidade de um refrigerador. Na busca por preencher uma das lacunas mais importantes da cadeia de produção de insetos alimentícios, as recomendações obtidas nessa investigação poderão ser integradas a um delineamento de estratégias aplicáveis pelos produtores de modo simples, econômico e eficaz na garantia de um produto seguro e estável do ponto de vista microbiológico.

**Palavras-chave:** Insetos alimentícios. Análises microbiológicas. Processamento. Embalagem.

## ABSTRACT

Edible insects represent a nutritious and sustainable option to meet human and animal nutrition demands. To ensure that these products reach the market with microbiological excellence until the end of their shelf life, it is essential to detect and mitigate possible contaminants throughout the production and storage process. In this sense, the present study evaluated the effect of sodium hypochlorite (HPC) and boiling (FEV), applied alone or in sequence, on the microbiological and storage quality of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*, BSF), one of the most prosperous species for large-scale production. For this, a 2x2 factorial experiment was conducted, using the HPC and FEV factors applied at the presence and absence levels. Quantitative analyzes of quality and spoilage indicator microorganisms (total aerobic mesophiles, Enterobacteriaceae, filamentous fungi and yeasts) were carried out. Subsequently, the effect of storage at room temperature ( $\pm 25.4^{\circ}\text{C}$ ) and refrigerated ( $\pm 5.2^{\circ}\text{C}$ ) under the same parameters was verified. It was observed that only the application of HPC followed by FEV resulted in significantly reduced counts for all microorganisms evaluated, when compared to samples that did not receive either procedure ( $p < 0.05$ ). Reductions ranged from 1.86 to 3.89 log CFU/g. When subjecting the BSF larvae to this sequential procedure and storing them at room temperature for 28 days, it was observed that all microbiological parameters analyzed remained stable and without significant changes ( $p > 0.05$ ). On the other hand, there was an increase of 1.78 log CFU/g ( $p < 0.05$ ) in the population of total aerobic mesophiles after the refrigerated storage period. Therefore, under such conditions, this type of storage cannot be recommended as it was not able to delay microbiological deterioration. Although nutritional and chemical analyzes are necessary, the results open perspectives for the feasibility of storing and transporting BSF larvae subjected to HPC and FEV in sequence without the need for a refrigerator. In the quest to fill one of the most important gaps in the edible insect production chain, the recommendations obtained in this investigation can be integrated into a design of strategies applicable by producers in a simple, economical and effective way to guarantee a safe and microbiologically stable product.

**Keywords:** Edible insects. Microbiological analyzes. Processing. Packaging.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01: Ciclo de vida da mosca-soldado-negra ( <i>Hermetia illucens</i> ) e a duração média dos diferentes estágios de desenvolvimento.....	31
--	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Composição centesimal de nutrientes (g/100g com base na matéria seca) de diferentes insetos alimentícios .....	15
Tabela 02: Contagens microbianas de larvas de <i>Tenebrio molitor</i> (inteiras e maceradas) antes e após diferentes tratamentos térmicos (valores expressos em log UFC/g) .....	23
Tabela 03: Contagens microbianas de <i>Acheta domesticus</i> antes e após diferentes tratamentos térmicos (valores expressos em log UFC/g) .....	23
Tabela 04: Contagens microbianas de <i>Brachytrupus</i> sp. antes e após tratamento térmico em tempos variados (valores expressos em log UFC/g) .....	23
Tabela 05: Contagens de mesófilos aeróbios de <i>Acheta domesticus</i> antes e após diferentes tratamentos térmicos (valores expressos em log UFC/g) .....	24
Tabela 06: Contagens de mesófilos aeróbios em diferentes insetos alimentícios antes e após diferentes combinações de tratamentos térmicos (valores expressos em log UFC/g) .....	25
Tabela 07: Contagens de <i>Staphylococcus aureus</i> em diferentes insetos alimentícios antes e após diferentes combinações de tratamentos térmicos (valores expressos em log UFC/g) .....	25
Tabela 08: Contagens microbianas mínimas e máximas detectadas nos substratos e nas larvas de <i>Hermetia illucens</i> neles criadas (valores expressos em log UFC/g) .....	33

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APPCC – Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle

BPF – Boas Práticas de Fabricação

BSF – *Black Soldier Fly*

EFSA – Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar

FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura.

Log UFC/g – Logaritmo de Unidades Formadoras de Colônia por grama

MAPA – Ministério da Agricultura e Pecuária

OMS – Organização Mundial da Saúde

ONU – Organização das Nações Unidas

SAN – Segurança Alimentar e Nutricional

UFC/g – Unidades Formadoras de Colônia por grama

UFC/mL – Unidades Formadoras de Colônia por mililitro

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	12
2	REVISÃO DE LITERATURA .....	14
2.1.	Uso de insetos alimentícios na nutrição humana e animal .....	14
2.1.1	Espécies e legislações.....	17
2.2	Cadeia produtiva dos insetos alimentícios .....	18
2.2.1	Riscos microbiológicos .....	19
2.2.2	Processos de descontaminação.....	21
2.2.3	Armazenamento e vida útil .....	28
2.3	Mosca-soldado-negra ( <i>Hermetia illucens</i> L.) .....	31
3.	OBJETIVOS.....	36
3.1	Geral.....	36
3.2	Específicos .....	36
4.	PRODUTO TÉCNICO-CIENTÍFICO .....	37
5.	CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	52
	REFERÊNCIAS .....	53

## 1 INTRODUÇÃO

O mundo se prepara para o ano de 2050 com estimativas alarmantes, onde a população global deverá alcançar 9,7 bilhões de pessoas (ONU, 2019), resultando em um aumento de mais de 50% na demanda geral por alimentos. Projeta-se um crescimento de aproximadamente 70% na procura por aqueles de origem animal (Searchinger *et al.*, 2019), o qual deverá ser acompanhado pelo aumento expressivo na demanda por ração animal (Van Huis, 2013). No entanto, importantes restrições podem comprometer a produção bem-sucedida dos volumes previstos, incluindo, a indisponibilidade de terras agrícolas e água doce, bem como eventos climáticos imprevisíveis como seca e inundações (Gazzoni, 2017).

Diante de tais perspectivas, a busca por práticas agroindustriais mais sustentáveis que garantam o abastecimento da população mundial tem se intensificado. Nesse sentido, a utilização de insetos como alimento e ração tem sido mencionada como uma solução nutritiva e sustentável para enfrentar os desafios futuros (Van Huis *et al.*, 2013). Além disso, a entomocultura, isto é, a produção de insetos está proporcionando oportunidades de negócios em todo o mundo, que vão desde os pequenos produtores até microempresas e multinacionais (Pyett *et al.*, 2023).

Considera-se que essa atividade possui riscos equivalentes aos encontrados na indústria alimentícia convencional (EFSA, 2015), e dentre esses, os de natureza microbiológica são particularmente relevantes (Garofalo *et al.*, 2019; Kooh *et al.*, 2019; Vandeweyer *et al.*, 2021). E se não forem devidamente controlados, podem resultar em efeitos nocivos à saúde de humanos e animais (Kooh *et al.*, 2019). Uma vez que a possível presença de microrganismos indesejáveis em produtos à base de insetos comprometem sua segurança e qualidade como alimento e ração (Kooh *et al.*, 2019), Van Huis (2015) considera que prevenção, detecção, identificação e mitigação de contaminantes microbianos são cruciais para uma produção segura e bem-sucedida.

Logo, à medida em que a entomocultura ganha popularidade e a comercialização de insetos alimentícios se consolida, torna-se necessária uma maior compreensão sobre as técnicas adequadas para a redução da população microbiana, processamento, embalagem e armazenamento (Kamau *et al.*, 2018). Tais aspectos tem sido objeto de estudo em muitas investigações (Campbell *et al.*, 2020; Fröhling *et al.*, 2020; Kamau *et al.*, 2020; Nyangena *et al.*, 2019; Saucier *et al.*, 2022; Ssepuuya *et al.*, 2016; Vandeweyer *et al.*, 2017).

Dentre as mais de 2000 espécies aptas para consumo (Jongema, 2015), destaca-se a mosca-soldado-negra (*Hermetia illucens* L.; Diptera: Stratiomyidae). Também denominada

*Black Soldier Fly* (BSF), essa espécie tem despertado cada vez mais atenção devido ao potencial da utilização da sua fase larval na alimentação de suínos, aves, peixes e animais de estimação (Barragan-Fonseca; Dicke; Van Loon, 2017). Contudo, o sucesso e a franca consolidação da sua criação a nível industrial dependerão não só da produção de alimentos e rações de alto valor nutricional, mas também da capacidade de se estabelecer uma cadeia produtiva confiável e consistente (Van Huis *et al.*, 2013). Neste cenário, a utilização de matérias-primas de excelente qualidade microbiológica é crucial para garantir a segurança do produto final (Kooh *et al.*, 2020). Além disso, para viabilizar a distribuição e o transporte de grandes quantidades de maneira segura, são necessárias técnicas de armazenamento apropriadas (Kamau *et al.*, 2020).

No entanto, empreendedores encontram-se diante de desafios provenientes da ausência de um manual de procedimentos padrão que possa ser adotado de forma generalizada, além de dúvidas persistentes sobre procedimentos adequados e otimizados relativos às atividades da entomocultura (Osimani *et al.*, 2021). Com isso, torna-se essencial buscar informações adicionais sobre métodos de processamento que possam assegurar a qualidade e segurança dos produtos derivados da BSF (Campbell *et al.*, 2020).

Partindo do exposto, esse trabalho pretende avaliar o efeito de dois tratamentos, sendo um térmico (fervura) e um químico (hipoclorito de sódio), aplicados isoladamente ou sequencialmente na qualidade microbiológica de larvas de BSF. Além disso, será analisado o efeito de diferentes temperaturas de armazenamento sob os mesmos parâmetros. Essa investigação visa contribuir para o esclarecimento de algumas incertezas do setor ao determinar as melhores condições de redução da carga microbiana e armazenamento que assegurem um produto com qualidade microbiológica adequada. Após definidas, as recomendações poderão ser integradas a um delineamento de estratégias aplicáveis pelos produtores de modo simples, econômico e eficaz.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Uso de insetos alimentícios na nutrição humana e animal

Enquanto a curva demográfica aponta para um futuro com uma população global de 9,7 bilhões até 2050 (ONU, 2019), as preocupações com a Segurança Alimentar e Nutricional (SAN) se intensificam. O conceito de SAN tem sido objeto de discussão no Brasil por, no mínimo, duas décadas (Leão *et al.*, 2013) e atualmente recebe a seguinte definição

A Segurança Alimentar e Nutricional consiste na realização do direito de todos ao acesso regular e permanente a alimentos de qualidade, em quantidade suficiente, sem comprometer o acesso a outras necessidades essenciais, tendo como base práticas alimentares promotoras de saúde que respeitem a diversidade cultural e que sejam ambiental, cultural, econômica e socialmente sustentáveis (BRASIL, 2006, p. 04).

Nesse contexto, surgem questionamentos acerca da capacidade dos recursos finitos do planeta, como terras agrícolas e água doce, em atender às demandas alimentares de uma população tão numerosa (FAO, 2021), tendo em vista que a produção global de alimentos precisará ser ampliada em 70% para que essa necessidade seja suprida (FAO, 2009). Além disso, Van Huis (2013) destaca em sua revisão que o aumento da procura e do consumo de proteína animal impacta também a demanda por ração animal, de modo que essa deverá seguir a mesma tendência para acompanhar a intensificação da produção pecuária. Contudo, a oferta de ingredientes proteicos tradicionalmente empregados na formulação de rações está sob ameaça devido ao uso concomitante na alimentação humana, redução das áreas agrícolas e os efeitos das mudanças climáticas (Mutungi *et al.*, 2019; Van Huis, 2013). Logo, a comunidade científica e a indústria têm reunido esforços na busca e na inserção gradual de fontes alternativas e sustentáveis a fim de aliviar a pressão sob a cadeia agropecuária tradicional (Van Huis *et al.*, 2013).

Das opções investigadas, os insetos alimentícios, isto é, aqueles que são adequados para serem incluídos em uma dieta, estão emergindo progressivamente como um grupo viável para complementar as fontes proteicas tanto para humanos quanto para animais (FAO, 2021). A princípio, os primeiros indícios da potencialidade da utilização de insetos para amenizar as dificuldades enfrentadas devido à escassez de alimentos em nível global surgiram na década de 1970 (Meyer-Rochow, 1975). E desde 2003, a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO, do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) tem se dedicado a trabalhar em projetos relacionados a esse tópico em diversos países ao redor do mundo. Entretanto, foi a partir de 2013 que o assunto ganhou maior notoriedade após a FAO publicar um livro que reuniu primeira vez as muitas oportunidades, bem como,

restrições sobre uso de insetos como alimento e ração (Van Huis *et al.*, 2013). E o interesse crescente em produzir e consumi-los reside nas suas características nutricionais, ambientais e econômico-sociais (Nowak *et al.*, 2016).

Em termos de nutrientes, os teores variam conforme a espécie, estágio de desenvolvimento e a composição do substrato que receberam como alimento (Meyer-Rochow *et al.*, 2021). A Tabela 01 exhibe a composição centesimal aproximada de algumas das principais espécies de insetos alimentícios, com base em uma compilação feita por Meyer-Rochow *et al.*, 2021.

Tabela 01: Composição centesimal de nutrientes (g/100g com base na matéria seca) de diferentes insetos alimentícios

Espécie	Estágio de desenvolvimento	Proteína	Lipídios	Fibras	ENN*	Cinzas
<i>Tenebrio molitor</i>	Larva	53,2	34,5	6,3	1,9	4,0
<i>Tenebrio molitor</i>	Pupa	51,0	32,0	12,0	-	-
<i>Zophobas morio</i>	Larva	46,0	35,0	6,0	-	-
<i>Hermetia illucens</i>	Pré-pupa	44,3	31,9	5,1	3,4	8,7
<i>Hermetia illucens</i>	Larva	39,0	32,6	12,4	-	14,6
<i>Acheta domesticus</i>	Adulto	62,6	12,2	8,0	12,3	5,0
<i>Gryllus assimilis</i>	Adulto	56,0	32,0	7,0	-	-

Fonte: Adaptado de Meyer-Rochow *et al.* (2021)

\*ENN: Extrato não-nitrogenado (indicativo de carboidratos solúveis)

Apesar das variações apresentadas, considera-se como consenso o fato de que os insetos são fontes valiosas de proteínas, ácidos graxos e uma variedade de micronutrientes (Bukkens, 1997; Kim *et al.*, 2019; Rumpold; Schlüter, 2013). Uma investigação conduzida por Rumpold e Schlüter (2013) reuniu dados de 236 espécies comestíveis pertencentes a 09 ordens taxonômicas e sua respectiva composição nutricional. A partir disso, é notório que o conteúdo proteico está presente em maior quantidade no corpo dos insetos, com média estimada entre 35 e 60%, o que supera valores encontrados em fontes vegetais como cereais, soja e lentilha (Kim *et al.*, 2019). Além disso, vale ressaltar que o perfil de aminoácidos atende aos requisitos propostos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para a nutrição humana (WHO; FAO; ONU, 2007).

Em seguida, o valor lipídico alcança médias que se encontram entre 13 e 33% (Rumpold; Schlüter, 2013), de modo que o conteúdo e a composição apresentam variações de acordo com o estágio de vida (Aguilar, 2021). Os ácidos graxos que constituem essa fração são



provenientes da dieta dos insetos ou sintetizados por seu organismo (Lucas *et al.*, 2020) e em determinadas espécies, foram encontrados os ácidos oleico, linoleico, linolênico e palmítico, considerados nutricionalmente importantes (Tzompa-Sosa *et al.*, 2014).

No que se refere aos micronutrientes, embora os insetos alimentícios geralmente careçam em termos de cálcio e potássio, eles têm potencial para fornecer cobre, ferro, magnésio, manganês, fósforo, selênio e zinco em quantidades adequadas e ainda podem ser incorporados a dietas com baixo teor de sódio. Quanto às vitaminas, eles podem ser considerados uma boa fonte de riboflavina, ácido pantotênico, biotina e em determinados casos, ácido fólico (Rumpold; Schlüter, 2013). De forma promissora, há evidências de que os teores dos nutrientes citados anteriormente podem ser modulados a partir da dieta fornecida a esses animais (Barragan-Fonseca; Dicke; Van Loon, 2017; Borel *et al.*, 2021; Oonincx *et al.* 2020)

No mais, os insetos também apresentam uma diversidade de elementos bioativos, que possuem propriedades prebióticas, imunostimulantes, antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias (Aguilar-Toalá; Cruz-Monterrosa; Liceaga, 2022; Lange; Nakamura, 2021). Tais compostos são essenciais para promover além da saúde humana (Stull, 2021), a saúde de animais, como peixes, aves e suínos (Gasco; Józefiak; Henry, 2021).

Não apenas a composição nutricional dos insetos merece destaque, como também o baixo impacto ambiental decorrente da sua produção. Criar e produzi-los pode ser considerada uma prática sustentável quando se compara à pecuária convencional: é requerido um menor uso de recursos naturais como terra, água e energia (Abbasi; Abbasi; Abbasi, 2016) e são emitidos níveis mais baixos de gases de efeito estufa, como metano, dióxido de carbono e óxido nitroso (Oonincx *et al.*, 2010). Além disso, a eficiência de conversão alimentar e a capacidade reprodutiva são consideradas superiores às dos animais tradicionais (Abbasi; Abbasi; Abbasi, 2016).

A entomocultura, que consiste na criação e produção de insetos, também deve ser reconhecida por seus benefícios econômicos e sociais. Ela caracteriza-se como uma oportunidade viável de subsistência tendo em vista que pode ser realizada para fins de consumo próprio bem como para geração de renda, dada a possibilidade de ser desenvolvida com baixos custos iniciais e demandar equipamentos simples e acessíveis (Hanboonsong; Jamjanya; Durst, 2013; Van Huis *et al.*, 2013). Ou ainda, a partir da coleta realizada diretamente da natureza, o que corresponde a aproximadamente 92% dos casos (Yen, 2015).

Por outro lado, também se observam consideráveis investimentos nesse setor (Albert, 2022; Costa, 2021). Tratam-se de empreendimentos novos ou que estão ampliando e/ou automatizando suas instalações a fim de aumentar a disponibilidade desta fonte alternativa de

proteína (Wynants *et al.*, 2017) e que operam desde pequenos produtores até microempresas e multinacionais (Pyett *et al.*, 2023). Isso é reflexo da franca expansão em escala global da entomocultura e países como Holanda, Áustria, Bélgica, França e África do Sul lideram o caminho das empresas especializadas (Osimani *et al.*, 2018a). Esse modo de operação é especialmente relevante para garantir o fornecimento contínuo de insetos alimentícios ao mesmo tempo em que contribui para sua segurança sanitária (Castro-López *et al.*, 2020; Murefu *et al.*, 2019).

### 2.1.1 Espécies de insetos alimentícios

O número de espécies de insetos aptas para consumo foi estimado inicialmente em 2000 (Jongema, 2015), contudo, em uma recente reavaliação, acredita-se que a real quantidade se aproxima de 1610 (Itterbeeck; Pelozuelo, 2022). Apesar da contradição, os mesmos autores reconhecem que os insetos alimentícios podem, em breve, superar a marca dos dois milhares de espécies à medida em que os estudos taxonômicos avançam por regiões pouco exploradas e análises moleculares são adotadas. Sendo assim, o valor exato de espécies adequadas para serem empregadas na alimentação humana e animal ainda permanece desconhecido (Yen, 2015).

Entretanto, algumas espécies têm recebido maior atenção por serem consideradas mais promissoras para uso nas indústrias de alimentos e rações. Entre elas: Mosca-doméstica (*Musca domestica*), Mosca-soldado-negra (*Hermetia illucens*), Larva-da-farinha ou Tenébrio-comum (*Tenebrio molitor*), Tenébrio-gigante (*Zophobas atratus*), Cascudinho (*Alphitobius diaperinus*), Traça-da-cera (*Galleria mellonella*), Traça-pequena-da-cera (*Achroia grisella*), Bicho-da-seda (*Bombyx mori*), Grilo-doméstico (*Acheta domesticus*), Grilo-doméstico-tropical (*Grylodes sigillatus*), Gafanhoto-migratório (*Locusta migratoria migratorioides*) e Gafanhoto-do-deserto (*Schistocerca americana*) (EFSA, 2015). A lista foi sugerida pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA, do inglês *European Food Safety Authority*) e essas possuem maior potencial para serem comercializadas especialmente no continente europeu, onde já existem autorizações para uso na nutrição de peixes, aves, suínos e humanos (Costa, 2021; Osimani *et al.*, 2018a; Skotnicka *et al.*, 2021).

No Brasil, o Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) traz em sua Instrução Normativa N°110 (IN 110/2020) algumas espécies de insetos incluídas em sua lista de matérias-primas aprovadas como ingredientes, aditivos e veículos para uso na alimentação animal, exceto animais ruminantes (Costa, 2021). Trata-se de: Barata-cinérea (*Nauphoeta cinerea*) adulta

desidratada, farinha de crisálida desengordurada ou não, farinha de larvas desidratadas de Mosca-soldado-negra (*Hermetia illucens*), grilo-preto (*Gryllus assimilis*) adulto desidratado e larvas desidratadas moídas ou não de Tenébrio-comum (*Tenebrio molitor*) e Tenébrio-gigante (*Zophobas morio*) (Brasil, 2020). No que se refere à alimentação humana, nenhuma autorização foi concedida até o momento.

No mais, as leis e regulamentos que regem o uso de insetos comestíveis como alimentos e rações se encontram em diferentes estágios de desenvolvimento em países da Ásia, América, África, Europa e Oceania (Varelas, 2019). No entanto, existe um esforço comum direcionado para um objetivo primordial compartilhado entre os continentes: garantir a qualidade dos produtos à base de insetos (Lahteenmaki-Uutela; Marimuthu; Meijer, 2021). Com a concretização de um marco legal completo para a produção e venda desses itens, incluindo normas e certificações internacionais pertinentes (Garofalo *et al.*, 2019), espera-se um aumento da confiança por parte do consumidor e uma facilitação do comércio desses produtos entre as nações (Imathiu, 2020). A resolução dessa pauta se faz essencial haja vista o crescente interesse na criação, processamento e comercialização a nível industrial dessa fonte proteica (Van Huis, 2020) e o progresso do setor depende de uma cadeia produtiva que seja consistente, segura e confiável.

## 2.2 Cadeia produtiva dos insetos alimentícios

À medida que a produção de insetos alimentícios em escala industrial aumenta, torna-se fundamental adotar métodos adequados de pós-colheita (Ojha *et al.*, 2021). O conceito de pós-colheita é definido por operações que compreendem a separação da matéria-prima dos resíduos do substrato, descontaminação, processamento, embalagem e armazenamento. Ou seja, consiste em um conjunto de atividades inter-relacionadas, que vão desde a coleta dos insetos até a decisão de uso do produto obtido (Mutungi *et al.*, 2019).

Os insetos alimentícios podem ser disponibilizados no mercado de três maneiras distintas: na forma integral (desidratados, congelados ou pré-cozidos), processados e transformados em pó ou em pasta e como extratos (EFSA, 2015). Considerando isso, a metodologia implementada durante os procedimentos pós-colheita é determinada pela espécie, riscos de segurança potenciais e o tipo de produto final desejado. Apesar dessas variáveis, é imprescindível que as melhores práticas de manejo e hábitos de higiene adequados sejam aplicados nessa cadeia de valor, visando garantir a máxima segurança dos produtos destinados ao consumidor final (Melgar-Lalanne; Hernández-Álvarez; Salinas-Castro, 2019; Ojha *et al.*,

2021). Segundo a EFSA, os riscos inerentes à criação de insetos são similares aos observados em outros sistemas de produção animal (EFSA, 2015; Wade; Hoelle, 2020) e especialmente na entomocultura, esses estão associados a fatores particulares de cada espécie e às condições de criação, pós-colheita, assim como de transporte (Varelas, 2019). Tais riscos são caracterizados como químicos, físicos, alergênicos e microbiológicos (Belluco *et al.*, 2013) e reiteram a necessidade de que todas as etapas da cadeia produtiva sigam as mesmas precauções empregadas a quaisquer outros alimentos convencionais ou para uso animal (Van Huis *et al.*, 2013).

### 2.2.1 Riscos microbiológicos

A categoria de contaminantes biológicos refere-se às espécies de microrganismos patogênicos, como bactérias e fungos e às substâncias tóxicas que eles produzem, além de vírus e parasitas (Vandeweyer *et al.*, 2021). E ao analisar os aspectos microbiológicos dos insetos comestíveis, é indispensável considerar que eles naturalmente abrigam microrganismos, muitos dos quais são essenciais para suas funções metabólicas e sobrevivência (Jordan; Tomberlin, 2021). A composição da sua microbiota está condicionada a fatores como a transmissão vertical, assim como as condições de criação e processamento, possibilitando a introdução de microrganismos a partir do substrato alimentar, do ambiente e dos manipuladores (Garofalo *et al.*, 2019; Osimani *et al.*, 2018a).

Todavia, a possível presença indesejada de contaminantes biológicos é um dos principais riscos associados à entomocultura (Garofalo *et al.*, 2019), tendo em vista que esses agentes nocivos afetam a segurança dos insetos como alimento, com implicações adversas para a saúde humana e animal, e impactam a sua qualidade enquanto produto (Kooh *et al.*, 2019). É importante notar que os insetos alimentícios são reconhecidos como seguros, desde que sejam adotadas as precauções apropriadas durante a criação e pós-colheita através de técnicas corretas e eficientes (Wade; Hoelle, 2020). E para que um produto seja considerado microbiologicamente seguro, é necessário que, em uma quantidade pré-determinada para análise, determinados contaminantes estejam abaixo de um nível definido ou não sejam detectados (Brasil, 2022). Os valores são expressos em Unidades Formadoras de Colônia por grama ou mililitro (UFC/g ou UFC/mL) ou ainda, a partir do logaritmo desse resultado (log UFC/g ou log UFC/mL) (Messina *et al.*, 2019).

Por outro lado, o perfil nutricional dos insetos ao mesmo tempo em que realça seu valor alimentar, também favorece a sobrevivência e crescimento de contaminantes quando as medidas preventivas são negligenciadas (Klunder *et al.*, 2012). Como por exemplo, durante a venda de largartas-mopane, cupins e percevejos por comerciantes ambulantes no Sul da África, onde os produtos são armazenados em recipientes abertos e ficam expostos a fatores ambientais adversos (Ramashia *et al.*, 2020). Nessas circunstâncias, observou-se a ocorrência de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, bolores e leveduras. Como tal, a presença de bactérias patogênicas e em potencial, assim como microrganismos comensais já foi detectada em diferentes espécies aptas para consumo (Garofalo *et al.*, 2019; Osimani *et al.*, 2018b).

A comunidade científica concorda que os gêneros bacterianos *Bacillus*, *Clostridium* e *Staphylococcus* representam os riscos mais expressivos para a segurança do uso de insetos com fins alimentícios. Por sua vez, os gêneros *Cronobacter*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Campylobacter*, *Salmonella* e *Listeria* aparentam constituir uma ameaça menor (Vandeweyer *et al.*, 2021). Esses gêneros são conhecidos por desencadarem as denominadas Doenças Veiculadas por Alimentos (DVA's) e os veículos compreendem alimentos de origem animal (carne, aves, ovos, peixe e leite) crus ou cozidos inadequadamente e produtos frescos, como os vegetais (Antunes; Novais; Peixe, 2020). Entre os sintomas mais frequentes estão vômitos, diarreia, febre, cólicas abdominais, dor de cabeça, desidratação, mialgia e artralgias (Switaj; Winter; Christensen, 2015).

Igualmente, os animais também podem ser infectados pelas bactérias mencionadas, além de serem capazes de transmiti-las para os seres humanos (Heredia; Garcia, 2018; Hurtado; Ocejó; Oporto, 2017; Singer *et al.*, 2007). No que se refere aos fungos produtores de micotoxinas, *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. estão associados aos riscos mais elevados (Vandeweyer *et al.*, 2021). Um exemplo notável é o *Aspergillus flavus*, conhecido por sintetizar aflatoxinas, agentes potencialmente cancerígenos, mutagênicos e teratogênicos para animais e humanos (Kooh *et al.*, 2019). Em relação aos demais contaminantes, vírus e parasitas associados ao consumo de insetos, considera-se que até o momento, esses apresentam um risco de segurança menos expressivo (EFSA, 2015). No entanto, destaca-se a necessidade de aprofundar as pesquisas nessa área (Vandeweyer *et al.*, 2021).

Diante do que foi apresentado e dada a importância de promover o consumo seguro de insetos por humanos e animais, diversas pesquisas tem sido direcionadas aos métodos de descontaminação e redução da carga microbiológica ao longo da sua cadeia produtiva (Fröhling *et al.*, 2020; Klunder *et al.*, 2012; Nyangena *et al.*, 2020; Yan *et al.*, 2023). A realização dos

estudos é baseada na detecção e/ou quantificação das bactérias patogênicas supracitadas, além de microrganismos indicadores de higiene e de deterioração. Kooh *et al.* (2019) e Garofalo *et al.* (2019) consideram a contagem total de mesófilos aeróbios como um dos indicadores microbiológicos mais frequentemente utilizados. Essa métrica oferece uma visão geral da carga microbiana em uma amostra alimentar e atua como um guia na previsão da sua vida útil. A análise da família Enterobacteriaceae, por sua vez, fornece indicativos sobre as condições higiênico-sanitárias adotadas em um sistema de produção e sua presença pode implicar na redução do prazo de validade. Em relação aos agentes deteriorantes, os fungos, incluindo bolores e leveduras, são particularmente relevantes. Como principais responsáveis pela deterioração dos alimentos, eles causam degradação de suas propriedades organolépticas e, conseqüentemente, diminuição da estabilidade de armazenamento.

Portanto, a avaliação quantitativa dos indicadores biológicos mencionados assume importante papel na verificação da eficácia das etapas de descontaminação no estado microbiológico do produto final (Megido *et al.*, 2017). Essa estratégia também contribui para uma revisão geral dos programas de gestão da qualidade na indústria de alimentos (Irkin, 2010). Contudo, quando aplicada à produção de insetos alimentícios, a prática é limitada pela falta de critérios microbiológicos adaptados para essa matriz (Garofalo *et al.*, 2019). Em certas ocasiões, os insetos são equiparados à carne ou peixe tradicional, mas devido à sua natureza particular, essa generalização não deve ser incentivada (Ojha *et al.*, 2021). Desse modo, é evidente a necessidade de implementação de uma estrutura legislativa com padrões microbiológicos específicos. Uma vez em vigor, essas diretrizes permitirão uma avaliação mais assertiva da qualidade e segurança dos insetos alimentícios e seus produtos derivados (Garofalo *et al.*, 2019).

### 2.2.2 Processos para a redução da carga microbiana de insetos alimentícios

A sequência de processamento para insetos destinados à alimentação se divide em três etapas essenciais: (1) colheita e pré-processamento; (2) descontaminação; e (3) embalagem e armazenamento (Ojha *et al.*, 2021). Inicialmente, o pré-processamento engloba a separação dos insetos do *frass* com auxílio de uma peneira, abate e remoção de asas e pernas, dependendo da espécie. As técnicas empregadas com maior frequência para o abate incluem congelamento e branqueamento (Caligiani *et al.*, 2019). O método de branqueamento envolve uma breve imersão do inseto em água fervente, seguida por um rápido resfriamento em água fria ou gelada. Este procedimento é eficaz tanto para inativar enzimas degradativas quanto para diminuir a

presença de mesófilos aeróbios, bolores e leveduras (Melgar-Lalanne; Hernández-Álvarez; Salinas-Castro, 2019).

Para atenuar a carga microbiana, uma fase de lavagem pode ser associada ao processo de abate, similar ao procedimento já adotado em alimentos convencionais (Ojha *et al.*, 2021). No estudo de Ng'ang'a *et al.* (2018), a simples implementação de um enxágue com água de torneira em grilos (*Ruspolia differens*) resultou em uma diminuição na presença de mesófilos aeróbios, endósporos bacterianos e bolores e leveduras. Embora a mesma redução não tenha sido observada para Enterobacteriaceae e bactérias ácido-lácticas, os achados sugerem a possibilidade de remoção superficial de alguns microrganismos. Contudo, para atingir um decréscimo mais substancial, é indicado o uso de agentes antimicrobianos, tais como etanol, peróxido de hidrogênio ou hipoclorito de sódio, adicionados à água. Isso foi comprovado por Crippen e Sheffield (2006) em seu estudo com cascudinhos (*Alphitobius diaperinus*).

Principalmente no que tange à descontaminação, ainda não se observa uma padronização dos métodos. Porém, um tratamento térmico breve seguido de secagem é uma das técnicas mais usualmente empregadas (Kamau *et al.*, 2018). Com base nisso, as empresas produtoras frequentemente otimizam suas técnicas por tentativa e erro (Wynants *et al.*, 2017) e optam pelos processos que mais se enquadram na sua realidade financeira e tecnológica (Costa *et al.*, 2021). No entanto, as descobertas e experiências adquiridas pelos negócios ainda não são de domínio público (Vandeweyer *et al.*, 2021). Interessantemente, a maior parte das patentes relacionadas aos insetos alimentícios registradas até 2019 dizem respeito aos métodos de processamento (Kim *et al.*, 2019).

No âmbito científico, diversas abordagens têm sido exploradas, seja com tratamentos isolados ou em conjunto (Fröhling *et al.*, 2020; Nyangena *et al.*, 2020). Procedimentos térmicos como fervura, cozimento a vapor, torrefação, defumação e fritura são comumente investigados. Paralelamente, diferentes técnicas de secagem como ao sol, em estufa, forno, micro-ondas ou liofilização são também avaliadas. Outras estratégias experimentadas incluem a fermentação e a marinação (Garofalo *et al.*, 2019; Melgar-Lalanne; Hernández-Álvarez; Salinas-Castro, 2019).

No estudo de Klunder *et al.* (2012) foi realizada uma comparação entre as contagens de mesófilos aeróbios, Enterobacteriaceae e esporos bacterianos presentes em larvas de tenébrio-comum (*Tenebrio molitor*) e em grilos (*Acheta domesticus* e *Brachytrupus* sp.). A análise foi executada antes e após exposição dos insetos aos tratamentos térmicos e os resultados estão detalhados nas Tabelas 02, 03 e 04.

Tabela 02: Contagens microbianas de larvas de *Tenebrio molitor* (inteiras e maceradas) antes e após diferentes tratamentos térmicos (valores expressos em log UFC/g)

	Frescas	Fervidas (10 min)		Assadas (10 min)	
		Inteiras	Maceradas	Inteiras	Maceradas
Mesófilos aeróbios	7,7	<1,7	2,5	<1,7	4,8
Enterobacteriaceae	6,8	<1,0	<1,0	2,2	2,6
Esporos bacterianos	2,1	<1,0	2,5	1,6	<1,0

Fonte: Adaptado de Klunder *et al.* (2012)

Tabela 03: Contagens microbianas de *Acheta domesticus* antes e após diferentes tratamentos térmicos (valores expressos em log UFC/g)

	Fresco	Fervido (05 min)	Frito (05 min)
Mesófilos aeróbios	7,2	1,7	2,7
Enterobacteriaceae	4,2	<1,0	<1,0
Esporos bacterianos	3,6	1,5	1,5

Fonte: Adaptado de Klunder *et al.* (2012)

Tabela 04: Contagens microbianas de *Brachytrupus* sp. antes e após tratamento térmico em tempos variados (valores expressos em log UFC/g)

	Fresco	Fervido	
		05 min	10 min
Mesófilos aeróbios	6,7	2,5	2,8
Enterobacteriaceae	4,4	<1,0	<1,0
Esporos bacterianos	4,4	2,5	2,7

Fonte: Adaptado de Klunder *et al.* (2012)

Os dados evidenciam que uma breve etapa de fervura e fritura foram eficazes na redução de mesófilos aeróbios e na eliminação de Enterobacteriaceae, apesar da presença remanescente de bactérias formadoras de esporos. Esse grupo engloba importantes gêneros como *Bacillus* spp. e *Clostridium* spp. (Osimani; Aquilanti, 2021). Adicionalmente, contagens de *T. molitor* foram obtidas a partir de larvas tanto na forma inteira quanto após serem maceradas. Verificou-se que a maceração resultou em uma maior contagem de bactérias viáveis, o que pode ser atribuído à dispersão da microbiota do trato intestinal do inseto por todo o produto (Klunder *et al.*, 2012).

A pesquisa conduzida por Fröhling *et al.* (2020) buscou estabelecer as condições de processamento ideais para a produção de farinha de grilo (*A. domesticus*) em escala industrial. O procedimento padrão, baseado em informações obtidas através de comunicação pessoal dos



autores com produtores tailandeses, envolve uma fase de aquecimento seguida de uma secagem em estufa a 110°C durante 08 horas. A partir disso, as amostras foram submetidas a três lavagens em água de torneira com agitação de 5 minutos cada. Em seguida, foram aplicados diferentes métodos de aquecimento, como fervura, cozimento a vapor e autoclavagem e a contagem microbiana foi realizada (Tabela 05).

Tabela 05: Contagens de mesófilos aeróbios de *Acheta domesticus* antes e após diferentes tratamentos térmicos (valores expressos em log UFC/g)

	Não-tratados	Tratados
Fervura (10 min)	8,42 ± 0,17	1,69 ± 0,04
Autoclavagem (121°C/15 min)	8,55 ± 0,08	< 1,52
Cozimento a vapor (10 min)	8,79 ± 0,52	1,56 ± 0,02

Fonte: Adaptado de Fröhling *et al.* (2020)

Os três tratamentos térmicos aplicados se mostraram efetivos na redução da presença de mesófilos aeróbios nos grilos. No entanto, o cozimento a vapor foi identificado como o mais viável para a aplicação industrial. Esta decisão é embasada na complexidade logística requerida pela autoclavagem em grande escala e na eficácia sutilmente menor da fervura na inativação microbiana (Fröhling *et al.*, 2020). Adicionalmente, os autores otimizaram o processo de secagem, diminuindo o período de 08 para 03 horas. Ao dispor os grilos em uma única camada nas prateleiras da estufa, a secagem pôde ser realizada em menor tempo, mantendo um teor de umidade satisfatório capaz de manter a redução microbiana obtida com o cozimento a vapor.

Por sua vez, Nyangena *et al.* (2020) investigaram os efeitos de diferentes técnicas tradicionais aplicadas isoladamente e em combinação, na qualidade microbiológica de indivíduos adultos de grilos (*A. domesticus* e *R. differens*), pré-pupas de mosca-soldado-negra (*Hermetia illucens*) e larvas de 5º instar de traça (*Spodoptera littoralis*). Os métodos de procedimento em questão abrangeram fervura (96°C/5 min), tostagem (150°C/5 min), secagem ao sol (2-3 dias) e secagem em estufa (60°C/2-3 dias). Além disso, estes foram combinados da seguinte maneira: fervura + secagem em estufa, fervura + secagem solar, torragem + secagem em estufa, torragem + secagem solar. Em síntese, quando se compara aos insetos não-tratados, os processos de fervura e tostagem aplicados isoladamente foram capazes de diminuir as populações de bactérias mesófilas aeróbicas e de *Staphylococcus aureus*, além de eliminar bolores, leveduras enterobactérias lactose-positivas e *Salmonella* spp. Contudo, uma única etapa de secagem em estufa apenas reduziu levemente as todas as populações bacterianas e fúngicas, enquanto a secagem ao sol não apresentou impacto significativo sobre esses

parâmetros. Vale mencionar que a presença de *Salmonella* foi detectada quando ambos procedimentos de secagem foram empregados de maneira isolada.

Quando se combinou as práticas de fervura ou tostagem a uma etapa subsequente de secagem observaram-se resultados ainda mais promissores e efetivos. Registrou-se uma redução considerável nas contagens de mesófilos aeróbios (Tabela 06) e de *S. aureus* (Tabela 07). Ademais, todas as amostras submetidas a um desses tratamentos mostraram-se isentas de fungos, enterobactérias lactose-positivas e *Salmonella* spp. Os pesquisadores concluem ressaltando a importância de estudos suplementares que investiguem a estabilidade da vida útil dos produtos derivados desses insetos alimentícios, considerando as condições de embalagem e armazenamento (Nyangena *et al.*, 2020).

Tabela 06: Contagens de mesófilos aeróbios em diferentes insetos alimentícios antes e após diferentes combinações de tratamentos térmicos (valores expressos em log UFC/g)

	Frescos	Fervura (96°C/5 min) + secagem em estufa (60°C/2-3 dias)	Tostagem (150°C/5 min) + secagem em estufa (60°C/2-3 dias)
<i>H. illucens</i>	7,7	1,6	1,8
<i>A. domesticus</i>	8,3	1,0	1,3
<i>R. differens</i>	9,1	1,8	2,0
<i>S. littoralis</i>	7,0	1,7	2,1

Fonte: Adaptado de Nyangena *et al.* (2020)

Tabela 07: Contagens de *Staphylococcus aureus* em diferentes insetos alimentícios antes e após diferentes combinações de tratamentos térmicos (valores expressos em log UFC/g)

	Frescos	Fervura (96°C/5 min) + secagem em estufa (60°C/2-3 dias)	Tostagem (150°C/5 min) + secagem em estufa (60°C/2-3 dias)
<i>H. illucens</i>	7,9	1,2	0,9
<i>A. domesticus</i>	8,3	1,3	1,0
<i>R. differens</i>	9,1	2,1	2,0
<i>S. littoralis</i>	7,7	1,9	1,6

Fonte: Adaptado de Nyangena *et al.* (2020)

Embora as técnicas de fermentação e marinação sejam ancestrais na preservação, processamento e melhora de propriedades organolépticas de alimentos, a aplicação destes processos às larvas de *T. molitor* não havia sido explorada antes do estudo conduzido por Borremans *et al.*, (2018). Assim sendo, os autores buscaram examinar a aplicabilidade destas

técnicas no âmbito da entomocultura. Inicialmente, duas soluções marinadas foram comparadas: uma baseada em vinho tinto e a outra utilizando molho de soja, complementadas com uma variedade de especiarias. As larvas foram submersas nestas soluções por um período de seis dias e transcorrido esse tempo, ambas variações da marinação se revelaram eficazes no combate à proliferação microbiana. Além disso, conseguiu-se estender a vida útil das larvas em pelo menos sete dias, em comparação com larvas apenas submetidas ao branqueamento. Contudo, foi observado um potencial risco microbiano, caso estejam presentes formadores de esporos patogênicos.

Para o processo fermentativo, que teve duração de duas semanas, as larvas foram trituradas e inoculadas com uma cultura inicial fermentadora. Cumprido esse intervalo, constatou-se que as contagens de bactérias ácido-láticas coincidiram consideravelmente com as contagens de mesófilos aeróbios, sugerindo que estas constituíam uma parte substancial da comunidade microbiana total. Esta observação estava alinhada com as expectativas, dado que os microrganismos das culturas iniciadoras adicionadas pertencem à categoria de produtores de ácido láctico. Outras contagens microbianas, incluindo endósporos bacterianos e clostrídios redutores de sulfito, foram encontradas abaixo do limite de detecção e Borremans *et al.* (2018) consideraram estes resultados promissores. Porém ressaltaram que as contagens por si só não fornecem uma visão abrangente da composição da microbiota, sendo necessárias análises metagenômicas adicionais.

Tecnologias emergentes como altas pressões hidrostáticas, campos elétricos pulsados e plasma frio atmosférico detêm um potencial significativo na indústria alimentícia, oferecendo melhorias na segurança e qualidade dos produtos, bem como na eficiência do processamento (Ojha *et al.*, 2021). No entanto, tais tecnologias permanecem pouco exploradas no setor de insetos alimentícios (Alles *et al.*, 2020; Bußler *et al.*, 2016; Campbell *et al.*, 2020). Fatores como a necessidade de profissionais altamente capacitados e investimentos iniciais significativos podem constituir barreiras significativas à sua ampla adoção (Priyadarshini *et al.*, 2019). Na entomocultura, ainda se dá preferência às técnicas tradicionais, reconhecidas por sua simplicidade e eficácia, especialmente ao levar em consideração a diversidade dos produtos derivados de insetos e os desafios associados à otimização desses processos (Ojha *et al.*, 2021).

Tendo em vista as informações apresentadas, a efetividade da descontaminação é suscetível a variáveis associadas a um mesmo método, como diferentes temperaturas ou tempos de exposição, além da espécie em questão e da sua carga microbiana inicial. As bactérias formadoras de esporos, em particular, constituem uma preocupação notável, dada a sua habilidade de sobreviver mesmo quando submetidas a procedimentos de descontaminação

comuns (Garofalo *et al.*, 2019). Embora Klunder *et al.* (2012) tenham sido capazes de mantê-las em níveis aceitáveis (inferiores a  $10^3$  UFC/g) durante o processo de fermentação, a identificação de métodos que possam erradicar esses microrganismos permanece como um desafio para a indústria de insetos alimentícios (Campenhout; Lachi; Vandeweyer, 2021; Osimani; Aquilanti, 2021). Por mais que processos como esterilização e tindalização apresentem eficácia contra tais formas bacterianas, essas técnicas podem comprometer a qualidade nutricional e sensorial dos insetos destinados ao consumo (Garofalo *et al.*, 2019).

Para lidar com a questão, a tecnologia "*hurdle*" ou tecnologia de barreira surgiu como um método promissor para melhorar a segurança alimentar, ao mesmo tempo em que minimiza a perda de qualidade nutricional e sensorial (Khan *et al.*, 2017). Essa metodologia envolve a implementação sequencial ou simultânea de duas ou mais técnicas de preservação em intensidades moderadas, otimizando a eficácia de cada tratamento individual e mitigando o impacto na qualidade dos alimentos (Liao *et al.*, 2020). É uma estratégia que tem sido amplamente utilizada em diversos produtos, como frutas e vegetais, carnes, laticínios, pescados, produtos de panificação, massas, alimentos enlatados, saladas, sucos e condimentos (Aaliya *et al.*, 2021). Enquanto muitas combinações já foram testadas para alimentos convencionais nas últimas décadas, os insetos representam uma nova matriz alimentar a ser investigada (Vandeweyer *et al.*, 2021).

A combinação de métodos de processamento térmicos e não-térmicos tem demonstrado ser uma maneira efetiva de oferecer um efeito sinérgico contra microrganismos responsáveis pela deterioração de alimentos (Aaliya *et al.*, 2021). Conforme evidenciado por Choi *et al.* (2019), a sequência de uma lavagem com água ativada por plasma (durante 120 minutos) seguida de aquecimento moderado (60°C por 5 minutos) em couve-chinesa (*Brassica rapa*) resultou em reduções consideráveis de mesófilos aeróbios, bactérias ácido-láticas, bolores, leveduras, coliformes, *S. aureus* e *Listeria monocytogenes*. De forma semelhante, a combinação de uma lavagem com hipoclorito de sódio (NaOCl) (100 ppm por 10 minutos) seguida de aquecimento moderado (60°C por 5 minutos) também revelou resultados satisfatórios. Os autores apontam que os agentes clorados, devido ao seu baixo custo e amplo espectro antimicrobiano, são os mais amplamente utilizados (Choi *et al.*, 2019).

Os sanitizantes aquosos mais populares incluem hipoclorito de sódio (NaOCl), dióxido de cloro (ClO<sub>2</sub>) e cloro (Cl<sub>2</sub>). Esses compostos, em contato com a água, produzem ácido hipocloroso (HOCl) e outras espécies reativas de cloro que têm a capacidade de danificar várias estruturas celulares bacterianas simultaneamente. Todavia, as restrições relativas à aplicação prática dessas substâncias precisam ser consideradas (Mendoza *et al.*, 2022). A facilidade em

seu uso favorece a adoção generalizada na prevenção de contaminação cruzada através da água de lavagem e na descontaminação de superfícies de alimentos frescos na indústria alimentícia (Huang; Vries; Chen, 2018; López-Gálvez; Allende; Gil, 2021). E apesar da ampla utilização desses agentes sanitizantes, especialmente na indústria de frutas e vegetais, eles permanecem inexplorados no setor de insetos alimentícios.

A cada ano, diversas combinações de intervenções de preservação são investigadas em ambientes laboratoriais ou escalas-piloto, na busca por métodos que maximizem a preservação da qualidade organoléptica e nutricional, ao mesmo tempo que oferecem proteção contra deterioração e microrganismos patogênicos (Aaliya *et al.*, 2021). Uma necessidade similar é evidente na indústria de insetos para alimentos e rações, onde a busca por uma possível padronização das tecnologias, aliada a mecanismos de garantia de qualidade e ferramentas de gerenciamento, se faz fundamental. Diretrizes específicas de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) podem contribuir para aperfeiçoar os processos tradicionais (Garofalo *et al.*, 2019). Com esse conhecimento, devem ser investigadas melhorias necessárias, incluindo as que se referem aos métodos de armazenamento, uma vez que a recontaminação pode surgir como uma preocupação adicional no pós-colheita (Mutungi *et al.*, 2019).

### 2.2.3 Armazenamento e vida útil

À medida em que a entomocultura se expande, torna-se cada vez mais necessária uma compreensão aprofundada sobre como evitar a perda de produtos e facilitar o transporte e a logística dessa cadeia de abastecimento. Isso implica no desenvolvimento de estratégias que maximizem a estabilidade dos insetos alimentícios durante o armazenamento (Campenhout; Lachi; Vandeweyer, 2021). Esses procedimentos precisam ser aplicáveis em grande escala e garantir que as mercadorias derivadas cumpram padrões nutricionais e microbiológicos adequados (Vandeweyer *et al.*, 2017).

Considera-se que o prazo de validade varia de acordo com o tipo de produto e, com as especificidades adotadas para a preservação, isto é, temperatura de armazenamento e tipo de embalagem (Ssepuyya *et al.*, 2016). Vale ressaltar que essas se adequam à espécie do inseto e à maneira como ele é disponibilizado para consumo, seja fresco, desidratado ou em pó (Melgar-Lalanne; Hernández-Álvarez; Salinas-Castro, 2019). Os mesmos autores apontam que, para preservar a qualidade de insetos frescos, o congelamento é a melhor opção, enquanto para os produtos desidratados e em pó, recomenda-se a refrigeração. Tal como evidenciado por

Ssepuyua *et al.* (2016), gafanhotos frescos (*Ruspolia nitidula*) tem um prazo de consumo de no máximo 02 dias. Por outro lado, este período pode ser significativamente prolongado para 22 semanas, o equivalente a 05 meses, quando os insetos são mantidos congelados. Além disso, os gafanhotos, quando desidratados e armazenados em condições de refrigeração ou à temperatura ambiente (desde que embalados à vácuo), podem atingir o mesmo período de estabilidade.

De Smet *et al.* (2019) desenvolveram um estudo para avaliar o impacto da temperatura de armazenamento (4°C e -21°C) na estabilidade microbiológica e química de uma pasta obtida a partir de larvas de *T. molitor*. Observou-se que após o armazenamento a -21°C, parâmetros como teor de umidade, atividade de água, valores de pH, cor e contagens microbianas permaneceram constantes por três meses. Embora os resultados tenham sido favoráveis, a oxidação lipídica não pôde ser completamente evitada. Em contrapartida, ao manter a pasta refrigerada a 4°C, a população de microrganismos ultrapassou a marca de 7 log UFC/mL, o que indica uma deterioração significativa do produto. Dessa forma, para insetos transformados em forma de pasta, o armazenamento refrigerado não é recomendado.

Em um estudo conduzido por Stoops *et al.* (2017), foram desenvolvidos produtos com características semelhantes à carne moída, utilizando larvas de cascudinho (*A. diaperinus*) e tenébrio-comum (*T. molitor*). Os pesquisadores analisaram a contagem microbiológica dos produtos armazenados em refrigeração, utilizando dois tipos de embalagens: uma comum (com ar) e outra com atmosfera modificada (60% CO<sub>2</sub>/40% N<sub>2</sub>). Verificou-se que, com a embalagem de atmosfera modificada, os produtos à base de *A. diaperinus* e *T. molitor* mantiveram a qualidade microbiológica adequada por 14 e 28 dias, respectivamente. A eficácia demonstrada pela embalagem em atmosfera modificada sugere a possibilidade de dispensar o uso de conservantes. No entanto, os autores ressaltam a necessidade de confirmação adicional da ausência de patógenos alimentares específicos antes da comercialização. No mais, para garantir uma maior estabilidade química e evitar a oxidação lipídica, que resulta em sabores rançosos, é aconselhável utilizar uma embalagem opaca que fornece proteção à luz (Ssepuyua *et al.*, 2016).

No estudo de Adámek *et al.* (2018), embora o tipo específico de embalagem não tenha sido detalhado, grilos adultos (*Gryllus assimilis*) foram abatidos com água fervente e posteriormente desidratados a 103°C por 12 horas. Quando armazenados de maneira hermética, ou seja, sem a entrada e saída de ar, esses insetos se mantiveram seguros para consumo por até três anos, ainda que estocados em temperatura ambiente. É importante ressaltar que a conclusão dos autores se baseia exclusivamente na análise microbiológica, não abordando outros parâmetros como aspectos químicos e nutricionais.

Imathiu (2020) destaca a necessidade de maior ênfase em técnicas que assegurem a qualidade dos produtos mesmo quando mantidos em temperatura ambiente. Com isso, seria possível dispensar métodos que demandam eletricidade, tornando o armazenamento menos oneroso. Métodos como secagem em estufa e acidificação com vinagre apresentam potencial na conservação de grilos (*A. domesticus*) sem a necessidade de uso de um refrigerador (Klunder *et al.*, 2012). Sobretudo, devido à sua simplicidade, o procedimento de secagem tem sido amplamente valorizado na pesquisa científica e na indústria de insetos para consumo (Campenhout; Lachi; Vandeweyer, 2021). Essa prática ganha importância ao considerar que quando se reduz o teor de água de um alimento, ou seja, o desidrata, reações de degradação química e microbiológica podem ser retardadas ou até mesmo interrompidas (Melgar-Lalanne; Hernández-Álvarez; Salinas-Castro, 2019). Os métodos comerciais de desidratação mais frequentemente aplicados no tratamento de insetos incluem a torrefação a 150°C por alguns minutos e secagem em estufa (60-80°C por 24-48 horas) (Liceaga, 2021).

As farinhas de insetos, geralmente, são produzidas a partir dos processos de desidratação mencionados, seguidos de moagem até se obter um pó fino (Liceaga, 2021). Além disso, conforme destacado por Skotnicka *et al.* (2021), existe uma expectativa de que esse tipo de produto detenha o maior potencial de prosperar no mercado. Essa forma de comercialização é especialmente interessante em razão da sua maior estabilidade ao longo do tempo, bem como da possibilidade de enriquecer nutricionalmente alimentos convencionais. Nota-se que principalmente itens de panificação como pães, biscoitos, massas e hambúrgueres têm recebido a incorporação dessa farinha proteica (Melgar-Lalanne; Hernández-Álvarez; Salinas-Castro, 2019). No âmbito da nutrição animal, também se destaca a capacidade da farinha de insetos para substituir parcialmente as rações derivadas da farinha de peixe e de soja (Sánchez-Muros; Barroso; Manzano-Agugliaro, 2014). Nesse contexto, a desidratação assume importantes funções não apenas na obtenção do produto desejado, mas também na extensão de sua vida útil, o que permite um consumo seguro por um período maior.

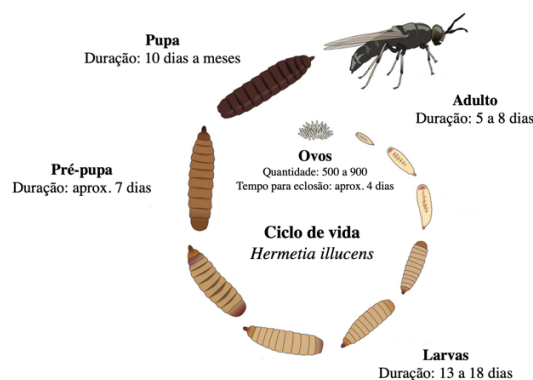
Conforme pontuado por Kamau *et al.* (2018), é fundamental compreender a capacidade de um alimento em absorver ou liberar umidade do ou para o ambiente para determinar o tipo de embalagem e as recomendações de armazenamento apropriadas. Com isso em mente, os autores realizaram uma investigação sobre as propriedades de hidratação de pós derivados de grilo (*A. domesticus*) e larvas de mosca-soldado-negra (*H. illucens*). A partir de modelagem matemática, estimou-se a vida útil desses produtos sob condições tropicais, a saber, com temperatura ambiente variando de 23 a 35°C e umidade relativa do ar de até 90%. Os resultados indicam que, ao armazenar os pós a 25°C com 5% de teor de umidade e em embalagens de

filmes de polietileno com 80  $\mu\text{m}$  de espessura, é possível alcançar um prazo de validade de 07 meses. Contudo, quando armazenados a 35°C, o prazo é reduzido para menos de 03 meses para o pó de grilo. Por outro lado, para que pó derivado de *H. illucens* tenha uma vida útil semelhante, mesmo nessa temperatura mais elevada, é necessária uma desidratação que resulte em um teor de umidade entre 3% e 4,5%. Após conduzir um experimento prático, o mesmo grupo de pesquisa constatou que o referido produto, com umidade a 4,5%, pode ser armazenado em recipientes plásticos com tampa sob temperatura de  $5,4 \pm 1,1^\circ\text{C}$  e umidade relativa do ar de  $97 \pm 5,7\%$ . Nessas condições, parâmetros químicos e microbiológicos se mantiveram estáveis por 06 meses. É importante ressaltar que a refrigeração apresentou um efeito significativo na preservação do produto, retardando a deterioração química e microbiológica em média três e cinco vezes, respectivamente (Kamau *et al.*, 2020).

### 2.3 Mosca-soldado-negra (*Hermetia illucens* L.)

Diante das preocupações com a disponibilidade e a sustentabilidade dos alimentos, o consumo de insetos como fonte de proteína e nutrientes surge como uma alternativa promissora tanto para animais quanto para seres humanos. No contexto da expansão da entomocultura em nível industrial, destaca-se a mosca-soldado-negra (*Hermetia illucens* - Linnaeus, 1758; Diptera: Stratiomyidae) como uma das espécies-chave (Gorrens *et al.*, 2021). Conhecida principalmente pela sua denominação em inglês, a *Black Soldier Fly* (BSF), é nativa da região neotropical (Marshall; Woodley; Hauser, 2015) a qual compreende do México Central ao sul do Brasil (Lima *et al.*, 2018). É considerada uma espécie cosmopolita (Callan, 1974) e de rápido ciclo de vida (Figura 01) (Zulkifli *et al.*, 2022).

Figura 01: Ciclo de vida da mosca-soldado-negra (*Hermetia illucens*) e a duração média dos diferentes estágios de desenvolvimento



Fonte: Adaptado de De Smet *et al.* (2018)



Aproximadamente 04 dias após a ovoposição, os ovos eclodem e dão origem às larvas que se alimentam por cerca de 02 semanas até atingirem o estágio de pré-pupas e após um período adicional também de 02 semanas, os adultos emergem. Vale ressaltar que o tempo de desenvolvimento está sujeito às variações das condições ambientais e do ecótipo (Tomberlin; Sheppard, 2002). Os indivíduos adultos não demonstram tendência de se aproximar dos seres humanos, tampouco possuem habilidade de morder ou picar, além de não atuarem como vetores de doenças específicas. No mais, não apresentam comportamento alimentar ativo, restringindo-se a consumir apenas água ou, em alguns casos, abstendo-se completamente da alimentação. Contudo, durante o estágio larval, são consumidores vorazes de ampla variedade de matéria orgânica, desde resíduos alimentares a dejetos de animais (Wang; Shelomi, 2017). Essa característica confere-lhes um papel importante na decomposição e reciclagem de nutrientes. Devido à sua habilidade em converter eficientemente resíduos em biomassa de alto valor, existe um interesse considerável no uso de larvas de BSF para o gerenciamento de resíduos orgânicos (Čičková *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2022). Makkar *et al.* (2014, p. 03) fornecem exemplos bem-sucedidos dessa aplicação, onde:

As larvas podem reduzir o acúmulo de esterco de galinha ou porco em 50% ou mais sem usar recursos extras, incluindo energia (Sheppard *et al.*, 1994, Barry, 2004, Newton *et al.*, 2005). Valores de redução de 65–75% no lixo doméstico foram observados em testes de campo na Costa Rica (Diener *et al.*, 2011).

Sob a perspectiva de segurança biológica, as larvas criadas nos substratos mencionados são consideradas inadequadas para consumo animal e humano (Wang; Shelomi, 2017). No entanto, se mostram ideais para a produção de biocombustível (Park *et al.*, 2022). Além disso, o substrato remanescente juntamente com os excrementos das larvas de BSF, denominado de “frass”, pode ser empregado como fertilizante na agricultura (Lopes; Yong; Lalander, 2022). As habilidades mencionadas reforçam a sustentabilidade associada a essa espécie, além dos aspectos sustentáveis relacionados à criação dos insetos alimentícios de modo geral.

Além dos dejetos orgânicos, as larvas de BSF também podem ser alimentadas com sobras de alimentos (Singh; Srikanth; Kumari, 2021) e subprodutos agroindustriais (Galassi *et al.*, 2021), considerados resíduos menos problemáticos do ponto de vista microbiológico. Nesse sentido, vários estudos têm sido direcionados à melhor compreensão da microbiota das larvas e como ela pode ser moldada e influenciada a partir da dieta fornecida (Vandeweyer *et al.*, 2021). Um exemplo relevante é o estudo realizado por Osimani *et al.* (2021), onde as larvas de BSF foram criadas em substratos elaborados a partir de resíduos de torrefação do café com diferentes níveis de inclusão de microalgas. A enumeração dos grupos microbianos se encontra descrita na Tabela 08.

Tabela 08: Contagens microbianas mínimas e máximas detectadas nos substratos e nas larvas de *Hermetia illucens* neles criadas (valores expressos em log UFC/g)

	Substratos	Larvas
Mesófilos aeróbios	8,3 a 7,8	7,7 a 9,1
Esporos bacterianos	3,1 a 4,8	3,1 a 6,7
Cocos coagulase-positivos	4,0 a 6,6	6,2 a 8,4
Bactérias ácido-láticas presumidas	8,0 a 8,6	6,5 a 7,8
Enterobacteriaceae	<1,0	2,5 a 4,9
Bolores e leveduras	4,3 a 7,7	5,4 a 7,4

Fonte: Adaptado de Osimani *et al.* (2021)

É notável que, como tendência geral, as larvas foram caracterizadas por contagens microbianas mais altas em relação aos substratos utilizados. Esse resultado evidencia que a qualidade microbiológica desses insetos não está condicionada apenas à contaminação inerente do substrato, mas também às condições do ambiente de criação e manuseio (Osimani *et al.*, 2021). Em larvas de BSF criadas em condições não-assépticas foram detectados patógenos de origem alimentar e patógenos oportunistas (Raimondi *et al.*, 2020). As análises genéticas revelaram a presença de *Bacillus cereus*, *Campylobacter* spp., *Clostridium perfringens*, estafilococos coagulase-positiva e *Listeriaceae* em larvas que não passaram por nenhum procedimento de desinfecção. Os autores ressaltam que se deve atentar para gêneros como *Bacillus*, *Myroides*, *Proteus*, *Providencia* e *Morganella*. Nesse estudo, eles foram encontrados em abundância nesses insetos e englobam espécies descritas como patógenos oportunistas, apresentando resistência a drogas ou causando morbidez severa. Ademais, Raimondi *et al.*, (2020) identificaram que a temperatura do ambiente de criação desempenha um papel fundamental na composição da microbiota de *H. illucens*.

Além dos aspectos previamente mencionados, é importante levar em consideração que durante o período de desenvolvimento das larvas, ocorre a deposição de seus excrementos no substrato. Além disso, independentemente da forma de comercialização, as larvas são disponibilizadas juntamente com seu trato gastrointestinal. Esses fatores contribuem para um aumento do risco de detecção de patógenos em larvas de BSF frescas, desidratadas, em pó ou em pasta (Saucier *et al.*, 2022).

Em contrapartida, há estudos que relatam uma capacidade inata dessas larvas em reduzir colônias bacterianas nocivas, particularmente da família Enterobacteriaceae. Erickson *et al.* (2004) relataram uma diminuição de 3,5 a 5,5 log UFC/g na população de *Salmonella enterica* sorovar *Enteritidis* e de 1,5 a 5 log UFC/g para *Escherichia coli* O157:H7 em esterco de galinha.

Por sua vez, Lalander *et al.* (2013) encontraram uma redução de 6 log UFC/g de *Salmonella* spp. em fezes humanas. Esse efeito redutor das larvas de BSF na concentração de microrganismos patogênicos pode ser considerado promissor no que se refere à reciclagem segura de dejetos (Vandeweyer *et al.*, 2021). De acordo com Bessa *et al.* (2020, p.2750),

Isso não apenas as torna uma poderosa ferramenta de redução de resíduos, mas também sugere que elas podem ser menos arriscadas de usar do que alguns outros insetos comestíveis, pois reduzem parte do risco bacteriano por meio de suas próprias vias biológicas (Wang & Shelomi, 2017).

Além do interesse considerável no uso de larvas de *H. illucens* para controle de resíduos orgânicos, elas são igualmente reconhecidas como fontes nutricionalmente valiosas de proteínas, lipídios, vitaminas e minerais (Zulkifli *et al.*, 2022). Embora os teores de proteína e gordura sejam afetados pela composição do substrato alimentar, os valores apontam consistentemente como sendo uma boa fonte desses nutrientes, com média de  $40,8 \pm 3,8\%$  de proteína e  $28,6 \pm 8,6\%$  de gordura (Wang; Shelomi, 2017). Isso indica um grande potencial para serem posteriormente implementadas na dieta humana (Bessa *et al.*, 2020).

Atualmente, há um crescente interesse na utilização das larvas de BSF na alimentação de suínos, aves, peixes e animais de estimação (Barragan-Fonseca; Dicke; Van Loon, 2017). Em parte, isso se deve à possibilidade de substituírem parcialmente a farinha de peixe e de soja. O aumento substancial do preço de mercado de ambas *commodities* na última década pode contribuir para que as larvas de BSF se tornem uma fonte proteica economicamente viável (Makkar *et al.*, 2014). Quando transformadas em farinha, podem substituir o farelo de soja na nutrição avícola brasileira trazendo importantes ganhos ambientais para o país (Allegretti *et al.*, 2018).

No que tange à sua utilização como ingrediente alimentar, ainda são necessárias mais informações sobre a adequação dos subprodutos agroalimentares e técnicas de processamento (Campbell *et al.*, 2020). Para Kamau *et al.* (2020), uma comercialização bem-sucedida depende de uma produção em massa combinada com métodos adequados de descontaminação, embalagem e armazenamento. Assim, assegura-se a qualidade dos produtos derivados de larvas de BSF.

Nesse sentido, a qualidade microbiológica das larvas de BSF em sua cadeia produtiva tem sido objeto de investigação. Além do estudo realizado por Nyangena *et al.* (2020) (seção 2.2.2), Campbell *et al.* (2020) também contribuíram para essa área de pesquisa. No estudo realizado por Campbell *et al.*, as larvas de BSF foram criadas em subprodutos de cervejaria e submetidas a diferentes métodos de descontaminação. Incluindo, banho-maria a 90°C por 10 e

15 minutos e processamento de alta-pressão: (a) 400 MPa por 1,5 min (b) 400 MPa por 10 min, (c) 600 MPa por 1,5 min, e (d) 600 MPa por 10 min. Os dados revelaram o banho-maria a 90°C por 10 minutos como o procedimento mais efetivo em termos de eliminação bacteriana e fúngica. Houve uma redução de 2,45, 5,65, 4,50 e 3,07 log UFC/g nas contagens de mesófilos aeróbios, Enterobacteriaceae, bactérias ácido-láticas e bolores e leveduras, respectivamente. A população dos últimos três grupos microbianos se encontrou abaixo do limite de detecção (2 log UFC/g) após o tratamento térmico.

A fim de avaliar a estabilidade de armazenamento de larvas de BSF, Saucier *et al.* (2022) as submeteu a tratamento térmico em água fervente por 04 minutos e as desidratou a 60°C por 6 h. As amostras foram armazenadas em ambiente protegido da luz e a uma temperatura  $21,6 \pm 0,4^\circ\text{C}$  por um período de 30 dias. Transcorrido esse tempo, as contagens microbianas diminuíram ligeiramente, com uma redução inferior a 1 log UFC/g ou permaneceram estáveis. Para os autores, com base nos regulamentos atuais do Canadá, a farinha de BSF produzida se mostrou adequada para incorporação em ração peletizada. Portanto, se processados adequadamente, esses insetos podem ser usados como um ingrediente alimentar estável (Saucier *et al.*, 2022). Além disso, uma cadeia produtiva otimizada, segura e padronizada tornará o desenvolvimento e o uso da mosca-soldado-negra desejável na indústria de nutrição animal e potencialmente, na humana. No mais, acredita-se no seu potencial para se tornar uma espécie de inseto com produtos sustentáveis, acessíveis e economicamente viáveis (Bessa *et al.*, 2020).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Avaliar o efeito dos métodos de descontaminação e de diferentes temperaturas de armazenamento na qualidade microbiológica de larvas de mosca-soldado-negra (*Hermetia illucens* L.).

#### 3.2 Específicos

- Submeter as larvas a diferentes métodos de descontaminação aplicados isoladamente ou em combinação;
- Determinar a contagem de microrganismos indicadores e deteriorantes;
- Definir a combinação de métodos de controle microbiano;
- Submeter as larvas ao procedimento de descontaminação mais eficaz e armazená-las em diferentes temperaturas;
- Indicar a condição ideal de armazenamento que garanta uma maior estabilidade microbiológica das larvas ao longo do tempo.

#### 4. PRODUTO TÉCNICO-CIENTÍFICO

Artigo submetido ao periódico “International Journal of Food Microbiology”. Esse possui fator de impacto 5,4 (Journal Impact Factor 2023™ - Clarivate™ Analytics).

#### **Sodium hypochlorite and boiling improve the microbiological and storage quality of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens* L.) Diptera: Stratiomyidae**

Haléxya Rodrigues Bavosa Pedais (halexar@gmail.com) <sup>a\*</sup>, Roberta Torres Careli (robertacareli@hotmail.com) <sup>a</sup>, Diego Vicente da Costa (prof.diegodacosta@gmail.com) <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institute of Agricultural Sciences, Federal University of Minas Gerais, Av. Universitária, 1000, Universitário, 39404-547, Montes Claros, Minas Gerais, Brazil

\*Corresponding author

#### **Abstract**

Black soldier fly (BSFL) larvae are promising for use in animal nutrition and ensuring their microbiological quality requires the mitigation of contaminants during production and storage. However, despite the expansion of the market, there is still a lack of standardized methods and legislation is incipient. Therefore, scientific data is essential to assist in the formulation of optimized procedures and future guidelines for this production chain. Then, the effect of sodium hypochlorite (HYP, 0.1% v/v, 15 min) and boiling (BOL, 10 min) on the microbiological quality of BSFL was evaluated, applying for the first time a chemical treatment in entomoculture. For this, a 2x2 factorial experiment was conducted, using the HYP and BOL factors applied at the presence and absence levels. When the interaction was significant, the factors were grouped into four treatments and subjected to the Tukey test. Quantitative analyzes of quality and spoilage indicator microorganisms were carried out (total viable counts - TVC, Enterobacteriaceae - ENT, yeasts and moulds - YM). Only the application of HYP followed by BOL resulted in significantly reduced counts for all microorganisms evaluated ( $p < 0.05$ ). This combination generated a microbiologically stable product without significant changes in the evaluated parameters ( $p > 0.05$ ) after 28 days of storage at room temperature ( $\pm 25$  °C). And microbial counts of 4.06 log CFU/g (TVC), <1.00 log CFU/g (ENT) and 2.68 log CFU/g (YM) meet the limits established by the International Platform of Insects for Food and Feed (IPIFF) and by the Brazilian Association of the Pet Products Industry (ABINPET), although physical-chemical analyzes will be necessary in the future. This study provides guidelines for BSF producers to ensure a microbiologically stable product. Furthermore, the data can contribute to the consolidation of a legislative framework with specific microbiological standards for the sector.

**Keywords:** edible insects, microbiological safety, processing, packaging, shelf-life.

**Declarations of interest:** none

**Funding statement:** “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais” (FAPEMIG).

## 1. Introduction

Black soldier fly larvae (BSFL; *Hermetia illucens*; Diptera: Stratiomyidae) are recognized as sources of proteins, lipids, vitamins and minerals (Barragan-Fonseca *et al.*, 2017). This profile positions them as attractive options for the nutrition of pigs, poultry, fish and pets (Barragan-Fonseca *et al.*, 2017; Makkar *et al.*, 2014). Consequently, BSFL have received significant attention amidst the expansion of industrial entomoculture (Gorrens *et al.*, 2021; Van Huis, 2020) and their use in animal feed is permitted in several countries, including Brazil (MAPA, 2020).

In general, one of the main risks associated with this sector is the possible presence of biological contaminants (Garofalo *et al.*, 2019; Vandeweyer *et al.*, 2021). Such agents involve the safety of insects as food and impact their quality as a product (Kooch *et al.*, 2019). However, with the adoption of correct and efficient guidelines, they can be recognized as safe (Wade and Hoelle, 2020). Therefore, as mass production of nutrients gains popularity and commercialization consolidates, a greater understanding of specific decontamination, processing, packaging and storage techniques becomes necessary (Kamau *et al.*, 2018).

The need to control the microbiological load of insects has led to research aimed at this purpose (Fröhling *et al.*, 2020; Klunder *et al.*, 2012; Nyangena *et al.*, 2020; Saucier *et al.*, 2022; Yan *et al.*, 2023). Especially because there is no standardization of procedures and legislation is limited (Vandeweyer *et al.*, 2021). In this scenario, producing companies adapt their processes according to their financial and technological capabilities (Costa *et al.*, 2021) and one of the most commonly used methodologies is heat treatment followed by drying (Kamau *et al.*, 2018).

Although thermal treatments are widely recommended and predominantly in the sector (Yan *et al.*, 2022), their integration with non-thermal methods, such as chemical sanitizers, has not yet been recorded in entomoculture. This combination has been applied in the conventional food industry (Choi *et al.*, 2019), proving to be an effective approach in offering a synergistic effect against microorganisms responsible for attracting food (Aaliya *et al.*, 2021).

Furthermore, the development of strategies that maximize the microbiological stability of insects over time is essential to avoid losses and enable the safe distribution and transportation of large volumes (Kamau *et al.*, 2020). Therefore, determining the ideal storage conditions for insects and their derived products has also been investigated (Adámek *et al.*, 2018; De Smet *et al.*, 2019; Kamau *et al.*, 2020; Klunder *et al.*, 2012; Ssepuuya *et al.*, 2016). And, among the sector's demands, is the definition of techniques that preserve the microbiological quality of products even when kept at room temperature (Imathiu, 2020).

This study analyzes the effect of two treatments - one thermal (boiling) and one chemical (sodium hypochlorite) - applied separately or sequentially on the microbiological quality of BSFL. The evaluation was carried out through the quantification of microorganisms conventionally investigated in food microbiology. Furthermore, it was examined how different storage temperatures affect these same parameters.

## 2. Materials and methods

The experiments were conducted in two stages, each carried out with larvae from different rearing cycles. To select the most appropriate method for reducing the microbial load, BSFL were used from a colony already established in the Entomoculture Laboratory of the Institute of Agricultural Sciences of the Federal University of Minas Gerais (ICA /UFMG) (Montes Claros, Brazil). In order to determine the ideal storage temperature, the larvae were also reared in the aforementioned laboratory, however, they originated from pupae kindly provided by Protin Biotech (23°26'18.0"S 46°56'35.1"W, Santana do Parnaíba, SP, Brazil).

### 2.1 Rearing conditions

The larvae were reared in plastic trays previously sanitized with 70% (v/v) alcohol in an air-conditioned environment at 26 °C, with 60% relative humidity and with a natural photoperiod. Corn bran fermented spontaneously for 72 hours after adding water (1:1.25) was supplied as a feeding substrate and it was provided in the nursery and rearing diets. The substrate was moistened with water every 2 days to maintain a moisture content of about 60–70% (adapted from Gorrens et al., 2021). After 20 days of collecting the eggs, the larvae reached the pre-pupa stage and were separated from the frass using a sanitized plastic sieve. These were properly divided into sterile plastic bags and stored in a freezer (BRM44H, Whirlpool, São Paulo, Brazil) at -18°C until they received the appropriate treatments.

### 2.2 Methods for reducing microbial load

The samples were thawed at room temperature ( $\pm 24$  °C) for 1 hour (Fröhling et al., 2020) and with the aid of a sieve in circular movements, the larvae were washed in running water for 1 minute to remove the frass remaining (Wynants et al., 2019). After that, they were subjected to microbial reduction methods applied alone or in combination, carried out in three individual and independent sample. Being: (1) immersion in sodium hypochlorite solution (NaClO 0.1% v/v) for 15 minutes (HYP) or (2) boiling for 10 minutes (BOL) or (3) immersion in sodium hypochlorite solution (NaClO 0.1% v/v) for 15 minutes + boiling for 10 minutes (HYPBOL) or (4) none of the mentioned procedures, considered as control (CTL). After the treatments, all samples underwent a drying process in a forced air circulation oven (81/81, Lucadema Científica, São José do Rio Preto, Brazil) at 60 °C for 48 hours. The air-oven dryer was sanitized with 70% (v/v) alcohol before each procedure. The dehydrated larvae were stored in sterile plastic bags vacuum-packed with the aid of a sealer (SVC380, Cetro, Bauru, Brazil), at room temperature and protected from light until microbiological analyzes were carried out. The treatment that exhibited the greatest reduction in the microbial groups analyzed was selected for the next step.

### 2.3 Storage conditions

To verify the ideal storage temperature that guarantees greater microbiological stability of the dehydrated larvae over time, the samples were subjected to the most effective processing among those mentioned in the previous section. Subsequently, packed in sterile plastic bags based on high-density polyethylene (HDPE) and then vacuum sealed in packaging made of Nylon and polyethylene. Storage took place protected from light and at room temperature at  $\pm 25$  °C or in a refrigerator at  $5 \pm 1$  °C (BRM44H, Whirlpool, São Paulo, Brazil) for 28 days. Throughout this period, temperature and relative humidity were monitored by a digital thermo-hygrometer (FEPRO-MUT60OS, Exbom, São Paulo, Brazil). Microbiological analyzes were carried out as described in the next section immediately after drying and once the aforementioned time had elapsed.

### 2.4 Microbiological analyses

In order to quantify the total viable count (TVC), Enterobacteriaceae (ENT) and yeasts and moulds (YM), the dehydrated larvae, still packaged, were carefully crushed with a porcelain pestle to expose the intestinal microbiota. Then, a homogenate was made with 10 g of sample plus 90 mL of 0.1% (w/v) peptone water (RM 001, Himedia, Bombay, India). Serial and successive decimal dilutions were carried out from the homogenate. Aliquots were plated in



duplicate in Petri dishes with the specific culture medium for each type of microorganism evaluated. TVC was enumerated by surface inoculation of a 100 µL aliquot in Plate Count Agar (Oxoid, Basingstoke, England) followed by incubation at 35 °C for 24-48 hours. ENT cultivation was carried out using depth inoculation with overlay of a 1000 µL aliquot on MacConkey Agar (M081, Himedia, Mumbai, India) followed by incubation at 35 °C for 48 hours. For the growth of YM present in the sample, a 100 µL aliquot was inoculated onto the surface of Potato Dextrose Agar (Kasvi, Madrid, Spain) acidified with 10% (w/v) tartaric acid (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil), followed by incubation at 30°C for 72-120 hours (adapted from Nyangena et al., 2020). Counts were calculated with the average of three replicates, each plated in duplicate, and then transformed into  $\text{Log}_{10} (X + 10)$  CFU/g to assume normality.

### 2.5 Statistical analyses

A 2x2 factorial experiment was carried out, with the factors sodium hypochlorite (H) and boiling (B) applied at the levels of presence (H1 and B1) and absence (H0 and B0). Therefore, HYP = H1B0, BOL = H0B1, HYPBOL = H1B1 and CTL = H0B0. To evaluate the effect of the factors considered and their respective interactions on the microbiological count of the three microbial groups, the data were subjected to Analysis of Variance. When the interaction effect between factors was significant ( $p \leq 0.05$ ), they were grouped into four treatments and the comparison of means between groups was analyzed using the Tukey-Kramer *post-hoc* test at the 5% level of significance ( $p \leq 0.05$ ) (adapted from Hurtado-Ribeira et al., 2023). In order to compare the mean counts obtained under different storage conditions, the Tukey test (HSD) was performed at a 5% significance level ( $p \leq 0.05$ ). All analyzes were performed using the statistical software SAS OnDemand for Academics (SAS Institute Inc. 2014).

## 3. Results and discussion

### 3.1 Effect of different methods of reducing microbial load on the microbiological quality of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*)

When evaluating the application of HYP and BOL in reducing the microbiological load of BSFL, it was found that HYP and BOL are capable of acting individually in decreasing the population of TVC, ENT and YM ( $p < 0.05$ ). Furthermore, it was assessed whether, when HYP is followed by BOL, there is an interaction between the procedures, whether positive or negative. It was noted that with regard to the reduction of ENT and YM, both methods interacted with each other ( $p < 0.05$ ). However, the same was not observed for TVC ( $p > 0.05$ ). This investigation did not evaluate whether BOL followed by HYP would result in different considerations and in view of this, it is proposed that the application of the procedures (BOLHYP) be reversed in future analyses. As far as we know, there are no studies on the interaction of procedures in the decontamination of BSFL.

In general, the high microbial load present in fresh and raw insects is well established (Garofalo et al., 2019). For this reason, Brazilian legislation recommends that non-heat-treated insects should not be included in the diet of production animals (MAPA, 2023). Therefore, to meet the minimum requirement for possible commercialization, it was decided to maintain drying (60 °C; 48 h) as a fixed step in all treatments. Drying, in addition to being a simple and economical method to reduce the microbiological load (Saucier et al., 2022), results in a dehydrated raw material with great commercial potential (Skotnicka et al., 2021).

The reductions in microbial populations in BSFL subjected to HYP, BOL, HYPBOL and CTL are shown in Table 01. As shown, the CTL counts reached values of 6.19 log CFU/g

for TVC, 2.86 log CFU/g for ENT and 3.63 log CFU/g for YM after oven drying. These results are in line with those obtained by Nyangena et al. (2020) and Saucier et al. (2022). Specific differences of  $\pm 1$  log found between studies are due to the difference in rearing substrates as well as the drying time applied.

Although the detection of foodborne pathogens was not included in the analyzes of the present study, a single drying step without prior decontamination processes proved to be insufficient to eliminate them. In the aforementioned investigations, the presence of *Salmonella* spp. was found. and *Staphylococcus aureus* (1.70 log CFU/g) (Nyangena et al., 2020), as well as *Listeria* spp. (3.55 log CFU/g) and *Clostridium* spp. (5.19 log CFU/g) (Saucier et al., 2022). Considering that the presence of *Salmonella* spp. in food samples is considered intolerable (Ministry of Health, 2022) and that such pathogens pose risks to human and animal health (Antunes et al., 2020), the findings indicate that drying alone may not be able to microbiologically guarantee BSFL safe for consumption.

Table 01: Microbial counts (log<sub>10</sub> CFU/g) in black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae after application of different microbial load reduction methods

	Total Viable Count	Enterobacteriaceae	Yeasts and Moulds
CTL	6,19* <sup>a</sup>	2,86 <sup>a</sup>	3,63 <sup>a</sup>
HYP	4,40* <sup>ab</sup>	1,36 <sup>b</sup>	3,68 <sup>a</sup>
BOL	4,10* <sup>bc</sup>	<1,10* <sup>b</sup>	2,85 <sup>a</sup>
HYPBOL	2,30* <sup>c</sup>	<1,00* <sup>b</sup>	1,69 <sup>b</sup>

CTL: oven drying at 60 °C for 48 hours. HYP: immersion in sodium hypochlorite solution (0.1% v/v) for 15 minutes and drying in an oven at 60°C for 48 hours. BOL: boiling water for 10 minutes and drying in an oven at 60 °C for 48 hours. HYPBOL: immersion in sodium hypochlorite solution (0.1% v/v) for 15 minutes, boiling water for 10 minutes and drying in an oven at 60 °C for 48 hours.

Note: Values followed by different letters in the same column differ statistically from each other ( $p > 0.05$ ) using the Tukey-Kramer test.

Values followed by (\*) refer to estimated counts because they are above or below the precision and repeatability range of the applied methodology (MAPA, 2018).

### 3.1.1 Immersion in sodium hypochlorite solution

When immersed in a chlorinated solution based on NaClO at 0.1% v/v for 15 minutes and subsequently subjected to drying, the larvae presented a load of 4.40 log CFU/g for TVC and 3.68 log CFU/g for YM. These are non-significant changes ( $p > 0.05$ ) in view of CTL. In disagreement, immersion of *calçots* (*Allium cepa* L.) in a 10% w/v NaClO solution for 1 minute resulted in approximate counts of 5.00 and 1.50 log CFU/g for TVC and YM, respectively (Zudaire et al., 2018).

In turn, only ENT decreased significantly when compared to CTL ( $p < 0.05$ ). The decrease was 1.50 log CFU/g, with the resulting count being 1.36 log CFU/g. The same level of reduction was also observed for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium when beet leaves (*Beta vulgaris*) were immersed in 6% v/v NaClO solution for 1 minute. For *Escherichia coli* O157:H7, 0.71 log CFU/g was reduced. Both microorganisms belong to the ENT family (Tomás-Callejas et al., 2012).

By simultaneously damaging several cellular components through oxidation, chlorine-based sanitizing solutions have an antimicrobial effect (Mendoza et al., 2022). And despite the

widespread use of NaClO in the fruit and vegetable industry (Tomás-Callejas et al., 2012; Zudaire et al., 2018), they remain unexplored in the entomoculture sector. The use of chemical treatments has not yet been recorded to reduce the microbiological load of insects for food purposes. Close to this, its use was made by Crippen and Sheffield (2006) aiming to decontaminate the external surface of adult mealworms (*Alphitobius diaperinus*), considered to transmit pathogens between the avian environment and surrounding areas. An average disinfection efficacy of 90% was found when the beetles were immersed in a solution of 2% v/v NaClO and 10% v/v Tween 80 for 8 minutes followed by immersion in 95% v/v Ethanol with subsequent evaporation of the compound. However, the data are not comparable to the results of this study.

### 3.1.2 Boiling

Since heat has the potential to destabilize a wide variety of cellular structures and functions (Dash et al., 2022), heat treatments are commonly used to reduce microbial populations in food and feed products (Aaliya et al., 2021; Saucier et al., 2022).

Therefore, the BSFL were subjected to boiling water for 10 minutes and dehydrated at 60 °C for 48 h. After the analyses, counts of 4.10, < 1.10 and 2.85 log CFU/g were recorded for TVC, ENT and YM, respectively, and similar values were reported by Saucier et al. (2022). By boiling BSFL for 5 minutes and drying them at 60 °C for 48–72 h, Nyangena et al. (2020) reported more pronounced antimicrobial effects, where the TVC population decreased to 1.7 log CFU/g and ENT and YM were completely eliminated. Although the drying time was not precisely reported by the authors, the influence of a possible longer duration of the procedure on the result obtained is inferred. Given that the effectiveness of heat treatments is conditioned by factors such as the method, time and intensity applied, as well as heat transfer parameters to the matrix and the intrinsic resistance of the microorganism (Saucier et al., 2022).

In this investigation, significant reductions ( $p < 0.05$ ) in relation to CTL were observed only for TVC and ENT. In contrast, YM exhibited greater resistance to a single heat treatment step without statistically significant changes in their population ( $p > 0.05$ ). Distinct observations can be made in the context of non-thermal high-pressure procedures. BSFL treatment at 400 MPa for 1.5 minutes demonstrated significant decreases in YM and ENT, while for TVC, the variation was not statistically significant (Campbell et al., 2020).

It is clear that, in general, ENT tend to be more sensitive to treatments compared to other microbial groups. However, the survival of TVC and YM may vary depending on the technique used. Therefore, the selection of the method must consider the intrinsic resistance of the target microorganisms, since the antimicrobial efficacy may not be uniform for the entire community present in the product. In this sense, decontamination processes based on simultaneous or successive application of techniques (“hurdle” technology) are a promising alternative in order to achieve multi-target elimination (Aaliya et al., 2021).

### 3.1.3 Immersion in sodium hypochlorite solution followed by boiling

While many “hurdle” combinations have already been tested for conventional foods in recent decades, edible insects represent a new matrix to be investigated (Aaliya et al., 2021; Vandeweyer et al., 2021). Therefore, we sought to subject BSFL to HYP and BOL sequentially and determine their antimicrobial potential. Counts of 2.30 log CFU/g were recorded for TVC and 1.69 log CFU/g for YM and, for ENT, the value was below the detection limit (<1.00 log CFU/g). For all microorganisms evaluated, the sequential application of the methods resulted in statistically lower counts than CTL ( $p < 0.05$ ). This shows the effectiveness of HYPBOL in bacterial and fungal reduction in BSFL.

Only this sequence resulted in a significant reduction ( $p < 0.05$ ) of YM, therefore, a synergistic fungicidal effect between the applied procedures is believed. The combination of thermal and non-thermal processing methods has been shown to be an effective way to offer a synergistic effect against microorganisms responsible for food spoilage (Aaliya et al., 2021). To the best of our knowledge, this is the first study that combined a chemical treatment with a thermal treatment in the microbial reduction of BSFL.

The antibacterial effect of the combination of washing with disinfectant and heat treatment has already been investigated on iceberg lettuce leaves (Kondo et al., 2006). The combined application of 200 ppm NaClO for 10 minutes and mild heat treatment at 50°C for 1 minute was effective in eliminating endogenous bacteria and foodborne pathogens, namely *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium DT104. In this sense, subsequent work that includes the potential of HYPBOL in the inactivation of food pathogens is necessary.

Aiming at the commercialization of dehydrated BSFL treated with HYPBOL, it was determined whether the numbers found were within acceptable limits (Table 02) using data published by the International Platform of Insects for Food and Feed (IPIFF) (IPIFF, 2022). Since Brazilian legislation allows the use of dehydrated BSFL as an ingredient for animal nutrition (MAPA, 2020), the comparison also included what is recommended by the Compendium Brasileiro de Alimentação Animal (2005) (Silva et al., 2021) and by Brazilian Association of the Pet Products Industry (ABINPET, 2019). The counts obtained were converted to CFU/g in order to better compare them with the values expressed by the organizations.

Table 02: Comparison between the microbial counts obtained and the acceptable limits established by different organizations

	HYPBOL (UFC/g)	IPIFF (UFC/g)	CBAA (UFC/g)	ABINPET (UFC/g)
Total Viable Count	$2,0 \times 10^3^*$	$5,0 \times 10^5$	$10^3$	-
Enterobacteriaceae	$< 1,0 \times 10^1^*$	$3,0 \times 10^2$	-	$10^1 - 3 \times 10^2$
Yeasts and Moulds	$6,6 \times 10^1$	$10^3$	$10^3$	$10^3$

HYPBOL: BSFL subjected to immersion in sodium hypochlorite solution (0.1% v/v) for 15 minutes, boiling for 10 minutes and drying in an oven at 60 °C for 48 hours. IPIFF: International Platform of Insects for Food and Feed. CBAA: Brazilian Compendium of Animal Nutrition. ABINPET: Brazilian Association of the Pet Products Industry

Note: Values followed by (\*) refer to estimated counts because they are above or below the precision and repeatability range of the applied methodology (MAPA, 2018).

(-): not informed.

Under the conditions used, the load of microorganisms investigated complies with the standards established by IPIFF and ABINPET. Although TVC counts are above the acceptability limit recommended by the CBAA, they are not considered unacceptable ( $10^4$  CFU/g) (Silva et al., 2021). Therefore, the results indicate HYPBOL as a promising sequence of methods to be recommended for the microbial reduction of BSFL. Before considering the need for adjustments to this protocol so that the resulting counts fully comply with CBAA standards, it is worth highlighting that the mentioned limits were not determined specifically for food insects. Therefore, the classification of results is limited by the absence of a legislative framework that contemplates microbiological criteria adapted exclusively for this matrix (Garofalo et al., 2019).

Therefore, only after the consolidation of a regulatory framework will it be possible to carry out a more assertive assessment of the microbiological quality of BSFL subjected to this type of processing. In addition to microbial safety, the choice of appropriate techniques must also consider nutritional and physicochemical parameters (Ojha et al., 2021). Therefore, it is recommended that subsequent studies include relevant analyses, just as Nyangena et al. (2019) and Saucier et al. (2022). Furthermore, López-Gálvez et al. (2019) emphasize that rinsing under running water reduces the accumulation of disinfection by-products. Therefore, a step like this may be necessary after immersing BSF larvae in HYP.

Although a single step of HYP or BOL statistically reduced the TVC and ENT populations, a substantial decrease in YM was observed only with the combined application of the procedures. Furthermore, HYPBOL was the treatment that exhibited the greatest numerical reduction of all microbial groups analyzed, providing the best possible microbiological quality under such conditions. Therefore, this was selected for the next step.

### 3.2 Effects of different storage temperatures on the microbiological quality of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*)

After production, the larvae must be stored and transported in a stable way, that is, without deterioration (Campenhout et al., 2021). Therefore, BSFL treated with HYPBOL and dehydrated were stored for 28 days at room temperature (HYPBOL T28 ROOM) and refrigerated (HYPBOL T28 REF) in order to evaluate their microbiological stability after this time. Analyzes immediately after drying were also performed (HYPBOL T0). The results are found in Table 03.

Table 03: Microbial counts ( $\log_{10}$  CFU/g) in black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae subjected to different temperatures during 28-day storage

	Total Viable Count	Enterobacteriaceae	Yeasts and Moulds
HYPBOL T0	4,31* <sup>a</sup>	<1,00* <sup>a</sup>	3,00 <sup>a</sup>
HYPBOL T28 ROOM	4,06* <sup>a</sup>	<1,00* <sup>a</sup>	2,68 <sup>a</sup>
HYPBOL T28 REF	6,09* <sup>b</sup>	<1,00* <sup>a</sup>	2,27 <sup>a</sup>

HYPBOL T0: BSFL subjected to immersion in sodium hypochlorite solution (0.1% v/v) for 15 minutes, boiling water for 10 minutes and drying in an oven at 60 °C for 48 hours. Microbiological analyzes carried out immediately at the end of the drying time. HYPBOL T28 ROOM: BSFL subjected to the aforementioned procedures and stored at room temperature ( $\pm 25.4$  °C) for 28 days. HYPBOL T28 REF: BSFL subjected to the mentioned procedures and stored refrigerated ( $\pm 5.2$  °C) for 28 days.

Note: Values followed by different letters in the same column differ statistically from each other ( $p > 0.05$ ) using the Tukey test (HSD).

Values followed by (\*) refer to estimated counts because they are above or below the precision and repeatability range of the applied methodology (MAPA, 2018).

At room temperature, an average temperature of 25.4°C and an average relative humidity of 68.5% were recorded. When comparing with non-stored samples (T0), non-significant variations ( $p > 0.05$ ) were observed in TVC (from 4.31 to 4.06 log CFU/g) and YM (from 3.00 to 2.68 log CFU/g). Initial analyses indicated that the samples were free of ENT (< 1.00 log CFU/g), a condition that was maintained during storage. Therefore, it is noted that in general, all microbiological parameters analyzed remained stable after 28 days.

A stability trend was also observed when BSFL blanched in boiling water for 4 minutes and dehydrated at 60°C for 6 hours were stored at room temperature (21°C) for 30 days (Saucier et al., 2022). According to the aforementioned authors, the dehydration process resulted in low water activity (between 0.24 and 0.37) of the BSF flour, which may have contributed to the control of microbial growth. Usually, the aim is to reach values below 0.60 since microbial

development is limited below this point (Vandeweyer et al., 2017). Considering that this parameter was not included in the present study, a future analysis is suggested.

Refrigerated storage was characterized by an average temperature of 5.2°C and an average relative humidity of 54%. In relation to T0, ENT remained unchanged (<1.00 log CFU/g) and YM did not vary ( $p > 0.05$ ). The TVC population increased from 4.31 to 6.09 log CFU/g ( $p < 0.05$ ). In agreement with these results, Stoops et al., (2017) reported an increase in the TVC load in products similar to ground meat made from mealworms (*Tenebrio molitor* and *Alphitobius diaperinus*) stored refrigerated ( $3 \pm 1^\circ\text{C}$ ) for 28 days.

In the present study, the increase of 1.78 log CFU/g observed is possibly due to the growth of psychrotrophic microorganisms. These are considered to be mainly responsible for the deterioration of cold-stored foods (Wei et al., 2019). In this scenario, the possible presence of the pathogens *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* is a potential risk as they are capable of multiplying at refrigeration temperatures (Bolívar and Pérez-Rodríguez, 2023; Webb et al., 2019) and, therefore, must be investigated posteriorly. Furthermore, TVC rate at 6.09 log CFU/g is considerably high since it is close to 7.00 log CFU/g, considered a general level of degradation and loss of quality of food products (Vandeweyer et al., 2017).

Refrigeration is considered to extend the shelf life of food, since the lower temperature slows down the metabolic processes of the microorganisms present (Russel, 2002). Consequently, the speed of deterioration is reduced, although the phenomenon is not completely inhibited (Wei et al., 2019). This finding was noted by Kamau et al., (2020), where in general, refrigeration ( $5.4 \pm 1.1^\circ\text{C}$ ) delayed the microbiological deterioration of BSFL, on average, by five times, in relation to conditions-ambient ( $23.6 \pm 2.7^\circ\text{C}$ ). However, contrary to expectations, this investigation found that cold storage accelerated the proliferation of some spoilage microorganisms. It is noted that the TVC population presented a load 2.03 log CFU/g higher when the samples were stored in the refrigerator.

In contrast, BSFL exhibited statistically similar counts of ENT and YM ( $p > 0.05$ ) regardless of the temperature over the storage period. Although it is common to expect microbial growth to be more pronounced at higher temperatures, other variables may have exerted a relevant influence (Amit et al., 2017). In both conditions used, the insects were kept under vacuum, an aspect that appears to have played a crucial role in prolonging the durability of the dehydrated larvae, even when stored at room temperature (Ssepuyua et al., 2016).

In addition to the fact that vacuum packaging contributes to improving the microbiological quality of the product, the absence of light inhibits lipid oxidation (Melgar-Lalanne et al., 2019) and therefore, both storages took place in this condition. Since BSFL has a notorious lipid content (Barragan-Fonseca et al., 2017), its derivative products are prone to oxidative rancidity, a phenomenon that negatively affects sensory and chemical stability and shelf life (Kamau et al., 2020; Ssepuyua et al., 2016). Therefore, chemical and sensory analyses should be included in future studies to accurately determine the quality of BSFL subjected to HYPBOL and stored for 28 days under protection from light.

To determine the ideal storage temperature for a minimum period of 28 days, ensuring that products derived from BSFL treated with HYPBOL comply with appropriate microbiological standards, a comparison was carried out with data published by IPIFF (IPIFF, 2022), CBAA (2005) (Silva et al., 2021) and ABINPET (ABINPET, 2019). Table 04 presents the corresponding data.

Table 04: Comparison between microbial counts obtained after 28 days of storage at different temperatures and acceptable limits established by different organizations

HYPBOL T28 ROOM (UFC/g)	HYPBOL T28 REF (UFC/g)	IPIFF (UFC/g)	CBAA (UFC/ g)	ABINPET (UFC/g)
-------------------------------	------------------------------	------------------	---------------------	--------------------

Total Viable Count	1,24 x 10 <sup>4*</sup>	1,45 x 10 <sup>6*</sup>	5,0 x 10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	-
Enterobacteriaceae	< 1,0 x 10 <sup>1*</sup>	< 1,0 x 10 <sup>1*</sup>	3,0 x 10 <sup>2</sup>	-	10 <sup>1</sup> – 3 x 10 <sup>2</sup>
Yeasts and Moulds	5,0 x 10 <sup>2</sup>	5,0 x 10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>

HYPBOL T28 ROOM: BSFL subjected to immersion in sodium hypochlorite solution (0.1% v/v) for 15 minutes, boiling water for 10 minutes and drying in an oven at 60 °C for 48 hours and stored at room temperature ( $\pm 25.4$  °C) for 28 days. HYPBOL T28 REF: BSFL subjected to the mentioned procedures and stored refrigerated ( $\pm 5.2$  °C) for 28 days. IPIFF: International Platform of Insects for Food and Feed. CBAA: Brazilian Compendium of Animal Nutrition. ABINPET: Brazilian Association of the Pet Products Industry

Note: Values followed by (\*) refer to estimated counts because they are above or below the precision and repeatability range of the applied methodology (MAPA, 2018).

(-): not informed.

The significantly high TVC population recorded in HYPBOL T28 REF does not meet the guidelines of any mentioned organization. Consequently, it is not possible to recommend refrigerated storage ( $\pm 5.2$  °C) during the evaluated time. This observation contradicts expectations, since refrigeration is often indicated as the best option to preserve the quality of food insects, especially after being subjected to a drying stage (Melgar-Lalanne et al., 2019).

The TVC count obtained in HYPBOL T28 ROOM is assessed as unacceptable according to CBAA criteria (Silva et al., 2021). However, according to the standards established by IPIFF and ABINPET, the use of BSFL subjected to such conditions is appropriate from a microbiological point of view. Therefore, this procedure can potentially be adopted by Brazilian BSF producers who aim to include the larvae in products intended, especially, for pets. The analysis of other quality parameters and the detection of foodborne pathogens are necessary to validate the feasibility of treating BSFL with HYPBOL, dehydrating them and keeping them at an average room temperature of 25 °C for at least 28 days until consumption. This would mean eliminating the need for a refrigerator, making storage less expensive in terms of electricity costs.

#### 4. Conclusion

Black soldier fly larvae treated with sodium hypochlorite solution followed by boiling remained microbiologically stable after storage at room temperature ( $\pm 25.4$  °C) for at least 28 days. However, additional analyzes are necessary. Furthermore, the data provides technical support to insect breeding and processing companies to optimize their procedures, while at the same time offering a scientific basis for the future development of specific microbiological standards for the sector.

#### References

Aaliya, B., Sunooj, K.V., Navaf, M., Akhila, P.P., Sudheesh, C., Mir, S.A., Sabu, S., Sasidharan, A., Hlaing, M.T. and George, J., 2021. Recent trends in bacterial decontamination of food products by hurdle technology: A synergistic approach using thermal and non-thermal processing techniques. *Food Res. Int.* 147, 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110514>

Adámek, M., Mlček, J., Adámková, A., Suchánková, J., Janalíková, M., Borkovcová, M. and Bednářová, M., 2018. Effect of different storage conditions on the microbiological characteristics of insect. *Potr. S. J. F. Sci.* 12, 248-253. <https://doi.org/10.5219/910>

- Amit, S. K., Uddin, M.M., Rahman, R., Islam, S.M.R. and Khan, M.S., 2017. A review on mechanisms and commercial aspects of food preservation and processing. *Agric. Food Secur.* 6, 1-22. <https://doi.org/10.1186/s40066-017-0130-8>
- Antunes, P., Novais, C. and Peixe, L., 2020. Food-to-humans bacterial transmission. *Microbiol. Spectr.* 8, 1-26. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mtbp-0019-2016>
- Barragan-Fonseca, K.B., Dicke, M. and Van Loon, J.J., 2017. A. Nutritional value of the black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) and its suitability as animal feed – a review. *J. of Insects as Food and Feed* 3, 105-120. <https://doi.org/10.3920/JIFF2016.0055>
- Bolívar, A. and Pérez-Rodríguez, F. 2023. *Listeria* in Food: Prevalence and Control. *Foods* 12, 1-2. <https://doi.org/10.3390/foods12071378>
- Brazilian Association of the Pet Products Industry (ABINPET), 2019. Pet Food Brazil Manual. São Paulo, SP, Brazil, 568 pp. Available at: [https://abinpet.org.br/wp-content/uploads/2020/05/manual\\_pet\\_food\\_ed10\\_completo\\_digital.pdf](https://abinpet.org.br/wp-content/uploads/2020/05/manual_pet_food_ed10_completo_digital.pdf)
- Campbell, M., Ortuño, J., Stratakos, A.Ch., Linton, M., Corcionivoschi, N., Elliott, T., Koidis, A. and Theodoridou, K., 2020. Impact of thermal and high-pressure treatments on the microbiological quality and in vitro digestibility of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. *Animals* 10, 1-10. <https://doi.org/10.3390/ani10040682>
- Choi, E.J., Park, H.W., Kim, S.B., Ryu, S., Lim, J., Hong, E.J., Byeon, Y.S. and Chun, H.H., 2019. Sequential application of plasma-activated water and mild heating improves microbiological quality of ready-to-use shredded salted kimchi cabbage (*Brassica pekinensis* L.). *Food Control* 98, 501-509. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.12.007>
- Costa, D. V. da., Vasconcelos, C., Araújo, A.C.A., Calil, R.M. and Santos, L.L.P., 2021. Insects for animal feed in Brazil: production and regulatory aspects. Alexa Cultural, Embu das Artes, São Paulo, 82 pp. Available at: <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/51283>
- Crippen, T.L. and Sheffield, C. 2006. External surface disinfection of the lesser mealworm (Coleoptera: Tenebrionidae). *J. Med. Entomol.* 43, 916 – 923. <https://doi.org/10.1093/jmedent/43.5.916>
- Dash, K.K., Fayaz, U., Dar, A.H., Shams, R., Manzoor, S., Sundarsingha, A, Dekae, P. and Khan, S.A. 2022. A comprehensive review on heat treatments and related impact on the quality and microbial safety of milk and milk-based products. *Food Chemistry Advances* 1, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100041>
- De Smet, J., Lenaerts, S., Borremans, A., Scholliers, J., Van der Borght, M. and Van Campenhout, L., 2019. Stability assessment and laboratory scale fermentation of pastes produced on a pilot scale from mealworms (*Tenebrio molitor*). *Food Sci. Technol.* 102, 113-121. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.12.017>
- Fröhling, A., Bußler, S., Durek, J. and Schlüter, O.K. 2020. Thermal impact on the culturable microbial diversity along the processing chain of flour from crickets (*Acheta domesticus*). *Front. Microbiol.* 11, 1-13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00884>



- Garofalo, C., Milanović, V., Cardinali, F., Aquilanti, L., Clementi, F. and Osimani, A. 2019. Current knowledge on the microbiota of edible insects intended for human consumption: A state-of-the-art review. *Food Res. Int.* 125, 1-32. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108527>
- Gorrens, E., Van Moll, L., Froominckx, L., De Smet, J. and Van Champenhout, L. 2021. Isolation and identification of dominant bacteria from black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) envisaging practical applications. *Front. Microbiol.* 12, 1-12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.665546>
- Grabowski, N. T. and Klein, G. 2017. Microbiological analysis of raw edible insects. *J. of Insects as Food and Feed* 3, 7-14. <https://doi.org/10.3920/JIFF2016.0004>
- Hurtado-Ribeira, R., Hernández, D.M., Villanueva-Bermejo, D., García-Risco, M.R., Hernández, M.D., Vázquez, L., Fornari, T. and Martin, D. 2023. The interaction of slaughtering, drying, and defatting methods differently affects oxidative quality of the fat from black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. *Insects* 14, 1-17. <https://doi.org/10.3390/insects14040368>
- Imathiu, S. 2020. Benefits and food safety concerns associated with consumption of edible insects. *NFS Journal* 18, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2019.11.002>
- International Platform of Insects for Food and Feed (IPIFF), 2022. Guide on good hygiene practices for European Union (EU) producers of insects as food and feed. IPIFF, Brussels, Belgium, 121 pp. Available at: <https://tinyurl.com/2fvk5wrp>
- Kamau, E., Mutungi, C., Kinyuru, J., Imathiu, S., Affognon, H., Ekesi, S., Nakimbugwe, D., and Fiaboe, K.K.M. 2020. Changes in chemical and microbiological quality of semi-processed black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) larval meal during storage. *J. of Insects as Food and Feed* 6, 417-428. <https://doi.org/10.3920/JIFF2019.0043>
- Kamau, E., Mutungi, C., Kinyuru, J., Imathiu, S., Tanga, C., Affognon, H., Ekesi, S., Nakimbugwe, D., and Fiaboe, K.K.M. 2018. Moisture adsorption properties and shelf-life estimation of dried and pulverised edible house cricket *Acheta domesticus* (L.) and black soldier fly larvae *Hermetia illucens* (L.). *Food Res. Int.* 106, 420 – 427. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.01.012>
- Klunder, H.C., Wolkers-Rooijackers, J., Korpela, J.M. and Nout, M.J.R., 2012. Microbiological aspects of processing and storage of edible insects. *Food Control* 26, 628-631. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.02.013>
- Kooh, P., Ververis, E., Tesson, V., Boué, G. and Federighi, M., 2019. Entomophagy and public health: a review of microbiological hazards. *Health* 11, 1272-1290. <https://doi.org/10.4236/health.2019.1110098>
- Kondo, N., Murata, M. and Isshiki, K., 2006. Efficiency of sodium hypochlorite, fumaric acid, and mild heat in killing native microflora and *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium* DT104, and *Staphylococcus aureus* attached to fresh-cut lettuce. *J. Food Prot.* 69, 323-329. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-69.2.323>
- López-Gálvez, F., Tudela, J.A., Allende, A. and Gil, M.I. 2019. Microbial and chemical characterization of commercial washing lines of fresh produce highlights the need for process

water control. *Innovative Food Sci. Emerg.* 51, 211-219. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.05.002>

Makkar, H.P.S., Tran, G., Heuzé, V. and Ankers, P. 2014. State-of-the-art on use of insects as animal feed. *Anim. Feed Sci. Technol.* 197, 1-33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.07.008>

Melgar-Lalanne, G., Hernández-Álvarez, A. and Salinas-Castro, A., 2019. Edible insects processing: traditional and innovative technologies. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 18, 1166-1191. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12463>

Mendoza, I. C., Luna, E.O., Pozo, M.D., Vásquez, M.V., Montoya, D.C., Moran, G.C., Romero, L.G., Yépez, X., Salazar, R., Romero-Peña, M. and León, J.C., 2022. Conventional and non-conventional disinfection methods to prevent microbial contamination in minimally processed fruits and vegetables. *LWT - Food Sci. Technol.* 165, 1-19. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113714>

Ministry of Agriculture and Livestock (MAPA), 2018. Normative Instruction No. 30, of June 26, 2018. Government of Brazil, Brasília, DF, Brazil. Available at: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/lfdal/legislacao-metodos-da-rede-lfdal/produtos-de-origem-animal>

Ministry of Agriculture and Livestock (MAPA), 2020. Normative Instruction No. 110, of November 24, 2020. Government of Brazil, Brasília, DF, Brazil. Available at: [https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/copy2\\_of\\_IN1102020LISTADEMATERIASPRIMAS.pdf](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/copy2_of_IN1102020LISTADEMATERIASPRIMAS.pdf)

Ministry of Agriculture and Livestock (MAPA), 2023. Circular Letter No. 33/2023 CGI/DIPOA/DAS/MAPA. Government of Brazil, Brasília, DF, Brazil, 6 pp.

Ministry of Health, 2022. Normative Instruction No. 161, of July 1, 2022. Government of Brazil, Brasília, DF, Brazil. Available at: [https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/IN\\_161\\_2022\\_.pdf/b08d70cb-add6-47e3-a5d3-fa317c2d54b2](https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/IN_161_2022_.pdf/b08d70cb-add6-47e3-a5d3-fa317c2d54b2)

Nyangena, D. N., Mutungi, C., Imathiu, S., Kinyuru, J., Affognon, H., Ekesi, S., Nakimbugwe, D. and Fiaboe, K.K.M., 2020. Effects of traditional processing techniques on the nutritional and microbiological quality of four edible insect species used for food and feed in East Africa. *Foods* 9, 1-16. <https://doi.org/10.3390/foods9050574>

Ojha, S., Bußler, S., Psarianos, M., Rossi, G. and Schlüter, O.K., 2021. Edible insect processing pathways and implementation of emerging technologies. *J. of Insects as Food and Feed* 7, 877-900. <https://doi.org/10.3920/JIFF2020.0121>

Russel, N. J., 2002. Bacterial membranes: the effects of chill storage and food processing. An overview. *Int. J. Food Microbiol.* 79, 27-34. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00176-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00176-9)

Saucier, L., M'ballou, C., Ratti, C., Deschamps, M.H., Lebeuf, Y. and Vandenberg, G.W., 2022. Comparison of black soldier fly larvae pre-treatments and drying techniques on the

microbial load and physico-chemical characteristics. *J. of Insects as Food and Feed* 8, 45-64. <https://doi.org/10.3920/JIFF2021.0002>

Silva, R. da., Baretta, A.M., Silva, L.L. da., Ternus, R.Z., Colpani, G.L., Fiori, M.A., Dalcanton, F., Zanetti, M. and Mello, J.M.M. de., 2021. Evaluation of the antimicrobial activity of poultry feed additives with zinc oxide nanoparticles. *Res., Soc. Dev.*10, 1-18. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i7.16830>

Skotnicka, M., Karwowska, K., Kłobukowski, F., Borkowska, A. and Pieszko, M., 2021. Possibilities of the development of edible insect-based foods in Europe. *Foods* 10, 1-22. <https://doi.org/10.3390/foods10040766>

Ssepuyya, G., Aringo, R.O., Mukisa, I.M. and Nakimbugwe, D., 2016. Effect of processing, packaging and storage-temperature based hurdles on the shelf stability of sautéed ready-to-eat *Ruspolia nitidula*. *J. of Insects as Food and Feed* 2, 245-253. <https://doi.org/10.3920/JIFF2016.0006>

Stoops, J., Vandeweyer, D., Crauwels, S., Verreth, C., Boeckx, H., Van der Borgh, M., Claes, J., Lievens, B. and Van Campenhout, L., 2017. Minced meat-like products from mealworm larvae (*Tenebrio molitor* and *Alphitobius diaperinus*): microbial dynamics during production and storage. *Innov. Food Sci. Emerg.* 41, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.02.001>

Tomás-Callejas, A., López-Gálvez, F., Sbodio, A., Artés, F., Artés-Hernández, F. and Suslow, T.V., 2012. Chlorine dioxide and chlorine effectiveness to prevent *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* cross-contamination on fresh-cut Red Chard. *Food Control* 23, 325-332. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.07.022>

Vandeweyer, D., De Smet, J., Van Looveren, N. and Van Campenhout, L., 2021. Biological contaminants in insects as food and feed. *J. of Insects as Food and Feed* 7, 807-822. <https://doi.org/10.3920/JIFF2020.0060>

Vandeweyer, D., Lenaerts, S., Callens, A. and Van Campenhout, L., 2017. Effect of blanching followed by refrigerated storage or industrial microwave drying on the microbial load of yellow mealworm larvae (*Tenebrio molitor*). *Food Control* 71, 311-314. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.07.011>

Van Huis, A., 2020. Insects as food and feed, a new emerging agricultural sector: a review. *J. of Insects as Food and Feed* 6, 27-44 <https://doi.org/10.3920/JIFF2019.0017>

Wade, M. and Hoelle, J., 2020. A review of edible insect industrialization: scales of production and implications for sustainability. *Environ. Res. Lett.* 15, 1-17. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/aba1c1>

Webb, M. D., Barker, G.C., Goodburn, K.E. and Peck, M.W. 2019. Risk presented to minimally processed chilled foods by psychrotrophic *Bacillus cereus*. *Trends Food Sci. Technol.* 93, 94–105, 2019 <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.08.024>

Wei, Q., Wang, X. Sun, D-W. and Pu, H. 2019. Rapid detection and control of psychrotrophic microorganisms in cold storage foods: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 86, 453-464. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.009>

Wynants, E., Fooninckx, L., Crauwels, S., Verreth, C., De Smet, J., Sandrok, C., Wohlfahrt, J., Van Schelt, J., Depraetere, S., Lievens, B., Van Miert, S., Claes, J. and Van Campenhout, L. 2019. Assessing the microbiota of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) reared on organic waste streams on four different locations at laboratory and large scale. *Microb. Ecol.* 77, 913-930. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1286-x>

Yan, X., Laurent, S., Federighi, M., Boué, G. and Jury, V. 2022. Processing edible insects into powders: a review of available processes and potential microbial inactivation methods. *J. of Insects as Food and Feed* 9, 325-338. <https://doi.org/10.3920/JIFF2021.0203>

Yan, X., Laurent, S., Hue, I., Cabon, S., Grua-Priol, J., Jury, V., Federighi, M. and Boué, G. 2023. Quality of *Tenebrio molitor* powders: effects of four processes on microbiological quality and physicochemical factors. *Foods* 12, 1-16. <https://doi.org/10.3390/foods12030572>

Zudaire, L., Viñas, I., Abadias, M., Simó, J. and Aguiló-Aguayo, I., 2018. Efficacy of chlorine, peroxyacetic acid and mild-heat treatment on the reduction of natural microflora and maintenance of quality of fresh-cut calçots (*Allium cepa* L.). *LWT - Food Sci. Technol.* 95, 339-345. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.05.005>

## 5. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse estudo fornece uma visão geral dos efeitos da água sanitária comercial e da fervura, aplicados isoladamente ou em combinação, na qualidade microbiológica de larvas de BSF criadas em escala laboratorial e alimentadas com farelo de milho. Observou-se que a eficácia dos procedimentos variou conforme o grupo microbiano. Entre os tratamentos, a aplicação sequencial dos métodos demonstrou uma ação antimicrobiana e antifúngica mais adequada e satisfatória. A partir de simulações da conformidade das contagens obtidas com limites aceitáveis não-oficiais para insetos, constatou-se que a carga microbiológica foi reduzida adequadamente, alcançando níveis toleráveis.

No que se refere aos testes de armazenamento com variação de temperatura, os resultados foram surpreendentes em relação às expectativas iniciais. Verificou-se que o armazenamento refrigerado não pôde ser recomendado uma vez que não foi capaz de retardar a deterioração microbiológica. Em contrapartida, existem indícios de que larvas de BSF tratadas com os métodos combinados podem ser armazenadas por pelo menos 28 dias em temperatura ambiente ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ) sem crescimento microbiano substancial. Isso abre perspectivas para a diminuição de custos relacionados ao armazenamento e à distribuição. Contudo, análises nutricionais e químicas devem ser conduzidas.

Ainda que sejam necessárias análises complementares para afirmar com plena confiança as declarações dessa investigação, esse estudo representa os passos iniciais de novos horizontes. Ao cumprir com os objetivos propostos, assume uma posição quase pioneira ao aplicar métodos químicos de descontaminação na entomocultura e em avaliar o armazenamento de BSF. Embora preliminares, os dados fornecem suporte técnico às empresas de criação e processamento de insetos para otimizarem seus procedimentos, ao mesmo tempo em que oferecem embasamento científico para a futura elaboração de padrões microbiológicos específicos para o setor. Desse modo, espera-se contribuir para o fortalecimento de uma cadeia produtiva sustentável capaz de garantir produtos seguros e de elevada qualidade para o mercado de nutrição animal e potencialmente, humana.

## REFERÊNCIAS

- AALIYA, B., *et al.* Recent trends in bacterial decontamination of food products by hurdle technology: A synergistic approach using thermal and non-thermal processing techniques. **Food Research International**, v. 147, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110514>
- ABBASI, T.; ABBASI, T.; ABBASI, S. A. Reducing the global environmental impact of livestock production: the minilivestock option. **Journal of Cleaner Production**, v.12, p. 1754-1766, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.02.094>.
- ADÁMEK, M., *et al.* Effect of different storage conditions on the microbiological characteristics of insect. **Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences**, v. 12, no. 1, p. 248-253, 2018. <https://doi.org/10.5219/910>
- AGUILAR-TOALÁ, J.E.; CRUZ-MONTERROSA, R.G; LICEAGA, A.M. Beyond human nutrition of edible insects: health benefits and safety aspects. **Insects**, v. 13, n. 1007, 2022. <https://doi.org/10.3390/insects13111007>
- ALBERT, H. **The Top 10 Insect-Powered Biotech Companies**. Disponível em <https://www.labiotech.eu/best-biotech/insects-biotechs-europe-industrial/>. Acesso em: 25 maio 2023
- ALLEGRETTI, G., *et al.* Insect as feed: An emergy assessment of insect meal as a sustainable protein source for the Brazilian poultry industry. **Journal of Cleaner Production**, v. 171, p.403-412, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.09.244>
- ALLES, M. C., *et al.* Bio-refinery of insects with Pulsed electric field pre-treatment. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 64, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102403>
- ANTUNES, P.; NOVAIS, C.; PEIXE, L. Food-to-humans bacterial transmission. **Microbiology Spectrum**, v. 08, n. 01, 2020. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mtbp-0019-2016>
- BARRAGAN-FONSECA, K. B.; DICKE, M.; VAN LOON, J. J. A. Nutritional value of the black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) and its suitability as animal feed – a review. **Journal of Insects as Food and Feed**, v.03, n.02, p.105-120, 2017. <https://doi.org/10.3920/JIFF2016.0055>
- BELLUCO, S., *et al.* Edible insects in a food safety and nutritional perspective: a critical review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.12, n. 03, p. 296-313, 2013. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12014>
- BESSA, L. W., *et al.* Why for feed and not for human consumption? The black soldier fly larvae. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.19, p.2747-2763, 2020. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12609>

BOREL, P., *et al.* Using black soldier fly larvae reared on fruits and vegetables waste as a sustainable dietary source of provitamin a carotenoids. **Food Chemistry**, v. 359, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129911>

BORREMANS, A., *et al.* Marination and fermentation of yellow mealworm larvae (*Tenebrio molitor*). **Food Control**, v. 92, p. 47-52, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.036>

BRASIL. **Lei Nº 11.346, de 15 de setembro de 2006.** Cria o Sistema Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional – SISAN com vistas em assegurar o direito humano à alimentação adequada e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 18 set. 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº110, de 24 de novembro de 2020.** Publica a lista de matérias-primas aprovadas como ingredientes, aditivos e veículos para uso na alimentação animal. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, DF, 04 dez. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Instrução Normativa Nº161, de 01 de julho de 2022.** Estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 06 jul. 2022.

BUßLER, S., *et al.* Cold atmospheric pressure plasma processing of insect flour from *Tenebrio molitor*: impact on microbial load and quality attributes in comparison to dry heat treatment. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 36, p.277-286. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.07.002>

BUKKENS, S. G. F. The nutritional value of edible insects. **Ecology of Food Nutrition**, v. 36, 1997. <http://dx.doi.org/10.1080/03670244.1997.9991521>

CALIGIANI, A., *et al.* Influence of the killing method of the black soldier fly on its lipid composition. **Food Research International**, v. 116, p. 276 – 282, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.033>

CALLAN, E. *Hermetia illucens* (L.) (Dipt., Stratiomyidae), a cosmopolitan American species long established in Australia and New Zealand. **The Entomologist's Monthly Magazine**, 1974

CAMPBELL, M., *et al.* Impact of thermal and high-pressure treatments on the microbiological quality and *in vitro* digestibility of black soldier fly (*Hermetia illucens*) Larvae. **Animals**, v. 10, n. 682, 2020. <https://doi.org/10.3390/ani10040682>

CAMPENHOUT, L. V.; LACHI, D.; VANDEWEYER, D. Potential of fermentation and vacuum packaging followed by chilling to preserve black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*). **Insects**, v. 12, n. 714, 2021. <https://doi.org/10.3390/insects12080717>

CASTRO-LÓPEZ, C., *et al.* An insight to fermented edible insects: a global perspective and prospective. **Food Research International**, v. 137, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109750>

CHOI, E. J., *et al.* Sequential application of plasma-activated water and mild heating improves microbiological quality of ready-to-use shredded salted kimchi cabbage

(*Brassica pekinensis* L.). **Food Control**, v. 98, p.501-509, 2019.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.12.007>

ČIČKOVÁ, H., *et al.* The use of fly larvae for organic waste treatment. **Waste Management**, v. 35, p.68-80, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2014.09.026>

COSTA, D. V. da., *et al.* **Insetos para alimentação animal no Brasil: aspectos de produção e regulatórios**. Alexa Cultural: São Paulo, 2021

COSTA, D. V. da. **Insetos na Nutrição Animal: Regulamentação e Mercado**. NutriNews Brasil – 4º Trimestre, 2021

CRIPPEN, T. L.; SHEFFIELD, C. External surface disinfection of the lesser mealworm (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Medical Entomology**, v, 43, n. 05, p. 916 – 923, 2006. <https://doi.org/10.1093/jmedent/43.5.916>

DE SMET, J., *et al.* Stability assessment and laboratory scale fermentation of pastes produced on a pilot scale from mealworms (*Tenebrio molitor*). **LWT- Food Science and Technology**, v. 102, p.113-121, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.12.017>

DE SMET, J., *et al.* Microbial community dynamics during rearing of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) and impact on exploitation potential. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 09, 2019. <https://doi.org/10.1128/AEM.02722-17>.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY – Scientific Committee. Scientific Opinion on a risk profile related to production and consumption of insects as food and feed. **EFSA Journal**, v. 13, n. 10, 60p, 2015. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4257>

ERICKSON, M. C., *et al.* Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* Serovar *Enteritidis* in chicken manure by larvae of the black soldier fly. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 04, p.685-690, 2004

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, **Declaration of the World Summit on Food Security**. Roma: World Summit on Food Security, 2009, 7 p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, **Looking at edible insects from a food safety perspective: Challenges and opportunities of the sector**. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2021, 90 p.  
<https://doi.org/10.4060/cb4094en>

FRÖHLING, A., *et al.* Thermal impact on the culturable microbial diversity along the processing chain of flour from crickets (*Acheta domesticus*). **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00884>

GALASSI, G., *et al.* Impact of agro-industrial byproducts on bioconversion, chemical composition, *in vitro* digestibility, and microbiota of the black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) larvae. **Journal of Insect Science**, v. 21, n. 01, 2021.  
<https://doi.org/10.1093/jisesa/ieaa148>



- GAROFALO, C., *et al.* Current knowledge on the microbiota of edible insects intended for human consumption: A state-of-the-art review. **Food Research International**, v. 125, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108527>
- GASCO, L.; JÓZEFIĄK, A.; HENRY, M. Beyond the protein concept: health aspects of using edible insects on animals. **Journal of Insects as Food and Feed**, v. 07, n. 05. p. 715-741, 2021. <https://doi.org/10.3920/JIFF2020.0077>
- GAZZONI, D. L. Como alimentar 10 bilhões de cidadãos na década de 2050? **Ciência e Cultura**, v. 69, n. 04, 2017. <http://dx.doi.org/10.21800/2317-66602017000400012>
- GORRENS, E., *et al.* Isolation and identification of dominant bacteria from black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) envisaging practical applications. **Frontiers in Microbiology**, v.12, 2021. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.665546>
- HANBOONSONG, Y.; JAMJANYA, T.; DURST, P. B. **Six-legged livestock: edible insect farming, collection and marketing in Thailand**. Bangkok: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013, 57p
- HEREDIA, N.; GARCIA, S. Animals as sources of food-borne pathogens: a review. **Animal Nutrition**, v. 4, n. 3, p. 250-255, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.04.006>
- HUANG, R.; VRIES, D. de.; CHEN, H. Strategies to enhance fresh produce decontamination using combined treatments of ultraviolet, washing and disinfectants. **International Journal of Food Microbiology**, v. 283, p.37-44, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.06.014>
- HURTADO, A.; OCEJO, M.; OPORTO, B. *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* shedding in domestic ruminants and characterization of potentially pathogenic strains. **Veterinary Microbiology**, v. 2010, p. 71-76, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.09.003>.
- IMATHIU, S. Benefits and food safety concerns associated with consumption of edible insects. **NFS Journal**, v. 18, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2019.11.002>
- ITTERBEECK, V.; PELOZUELO, L. How many edible insect species are there? A not so simple question. **Diversity**, v. 14, n. 02, 2022. <https://doi.org/10.3390/d14020143>
- IRKIN, R. Determination of microbial contamination sources for use in quality management of cheese industry: “Dil”cheese as an example. **Journal of Consumer Protection and Food Safety**, v.5, p. 91-96, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00003-009-0525-y>
- JONGEMA, Y. **List of Edible Insects of the World**; Wageningen University and Research, Department of Entomology of Wageningen University: Wageningen, The Netherlands, 2015.
- JORDAN, H. R.; TOMBERLIN, J. K. Microbial influence on reproduction, conversion, and growth of mass produced insects. **Current Opinion in Insect Science**, v. 48, p. 57-63, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2021.10.001>

KAMAU, E., *et al.* Changes in chemical and microbiological quality of semi-processed black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) larval meal during storage. **Journal of Insects as Food and Feed**, v.06, n. 04, p.417-428, 2020. <https://doi.org/10.3920/JIFF2019.0043>

KAMAU, E., *et al.* Moisture adsorption properties and shelf-life estimation of dried and pulverised edible house cricket *Acheta domesticus* (L.) and black soldier fly larvae *Hermetia illucens* (L.). **Food Research International**, v. 106, p. 420 – 427, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.01.012>

KHAN, I., *et al.* Hurdle technology: a novel approach for enhanced food quality and safety - A review. **Food Control**, v. 73, p. 1246-1444, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.11.010>

KIM, T, K., *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. 04, 2019. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2019.e53>

KLUNDER, H. C., *et al.* Microbiological aspects of processing and storage of edible insects. **Food Control**, v. 26, p. 628 – 631, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.02.013>

KOOH, P., *et al.* Entomophagy and public health: a review of microbiological hazards. **Health**, v. 11, p. 1272 – 1290, 2019. <https://doi.org/10.4236/health.2019.1110098>

KOOH, P., *et al.* Control of biological hazards in insect processing: application of HACCP method for yellow mealworm (*Tenebrio molitor*) powders. **Foods**, v. 9, n. 11, 2020. <https://doi.org/10.3390/foods9111528>

LAHTEENMAKI-UUTELA, A.; MARIMUTHU, S. B.; MEIJER, N. Regulations on insects as food and feed: a global comparison. **Journal of Insects as Food and Feed**, v. 07, n. 08, p. 849-856, 2021. <https://doi.org/10.3920/JIFF2020.0066>

LALANDER, C., *et al.* Faecal sludge management with the larvae of the black soldier fly (*Hermetia illucens*) — From a hygiene aspect. **Science of the Total Environment**, v-458-460, p.312-318, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.04.033>

LANGE, K. W.; NAKAMURA, Y. Edible insects as a source of food bioactives and their potential health effects. **Journal of Food Bioactives**, v. 14, p. 4-9, 2021. <https://doi.org/10.31665/JFB.2021.14264>

LEÃO, M., *et al.* **O direito humano à alimentação adequada e o sistema nacional de segurança alimentar e nutricional**. Brasília: Ação Brasileira pela Nutrição e Direitos Humanos, 2013, 263 p.

LIAO, X., *et al.* Cold Plasma–Based Hurdle Interventions: New Strategies for Improving Food Safety. **Food Engineering Reviews**, v. 12, p.321-332, 2020. <https://doi.org/10.1007/s12393-020-09222-3>

LICEAGA, A. M. Processing insects for use in the food and feed industry. **Current Opinion in Insect Science**, v.48, p. 32-36, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2021.08.002>

LIMA, N. E. de., *et al.* Caracterização e história biogeográfica dos ecossistemas secos neotropicais. **Rodriguésia**, v. 69, n. 04, 2018, p. 2209-2222. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201869445>

LIU, T., *et al.* Black soldier fly larvae for organic manure recycling and its potential for a circular bioeconomy: A review. **Science of the Total Environment**, v. 833, 2022. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155122>

LOPES, I. G., YONG, J. W. H.; LALANDER, C. Frass derived from black soldier fly larvae treatment of biodegradable wastes. A critical review and future perspectives. **Waste Management**, v. 142, p.65-76, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2022.02.007>

LÓPEZ-GÁLVEZ, F.; ALLENDE, A.; GIL, M. I. Recent progress on the management of the industrial washing of fresh produce with a focus on microbiological risks. **Current opinion in Food Science**, v. 38, p.46-51, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.10.026>

MAKKAR, H. P. S., *et al.* State-of-the-art on use of insects as animal feed. **Animal Feed Science and Technology**, v.197, p.1-33, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.07.008>

MARSHALL, S. A.; WOODLEY, N. E.; HAUSER, M. The historical spread of the black soldier fly, *Hermetia illucens* (L.) (Diptera, Stratiomyidae, Hermetiinae), and its establishment in Canada. **Journal of the Entomological Society of Ontario**, v. 146, p.51-54, 2015.

MEGIDO, R. C., *et al.* Microbiological load of edible insects found in Belgium. **Insects**, v. 08, n. 12, 2017. <https://doi.org/10.3390/insects8010012>

MELGAR-LALANNE, G.; HERNÁNDEZ-ÁLVAREZ, A.J.; SALINAS-CASTRO, A. Edible insects processing: traditional and innovative technologies. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, n. 04, p. 1166-1191, 2019. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12463>

MENDOZA, I. C., *et al.* Conventional and non-conventional disinfection methods to prevent microbial contamination in minimally processed fruits and vegetables. **LWT – Food Science and Technology**, v. 165, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113714>

MESSINA, C. M., *et al.* Microbiological profile and bioactive properties of insect powders used in food and feed formulations. **Foods**, v. 08, n. 09, 2019. <https://doi.org/10.3390/foods8090400>

MEYER-ROCHOW, V. B. Can insects help to ease the problem of world food shortage? **Search**, v. 06, n. 07, 1975

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**, v. 10, n. 05, 2021. <https://doi.org/10.3390/foods10051036>

MUREFU, T. R., *et al.* Safety of wild harvested and reared edible insects: a review. **Food Control**, v. 101, p. 209–224, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.03.003>

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. 02, 2019. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1365330>

NG'ANG'A, J., *et al.* Microbial quality of edible grasshoppers *Ruspolia differens* (Orthoptera: Tettigoniidae): From wild harvesting to fork in the Kagera Region, Tanzania. **Journal of Food Safety**, n. 01, v. 39, 2018. <https://doi.org/10.1111/jfs.12549>

NOWAK, V., *et al.* Review of food composition data for edible insects. **Food Chemistry**, v.193, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.114>

NYANGENA, D. N., *et al.* Effects of traditional processing techniques on the nutritional and microbiological quality of four edible insect species used for food and feed in East Africa. **Foods**, v. 9, n. 574. <https://doi.org/10.3390/foods9050574>

OJHA, S., *et al.* Edible insect processing pathways and implementation of emerging technologies. **Journal of Insects as Food and Feed**, v. 07, n. 05, p. 877-900, 2021. <https://doi.org/10.3920/JIFF2020.0121>

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. 05, n. 12, 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014445>

OONINCX, D. G. A. B., *et al.* Dietary enrichment of edible insects with omega 3 fatty acids. **Insect Science**, v. 27, n. 3 p. 500-509, 2020. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12669>

OSIMANI, A.; AQUILANTI, L. Spore-forming bacteria in insect-based foods. **Current opinion in Food Science**, v. 37, p. 112-117, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.10.011>

OSIMANI, A., *et al.* Microbial dynamics in rearing trials of *Hermetia illucens* larvae fed coffee silverskin and microalgae. **Food Research International**, v. 140, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.110028>

OSIMANI, A., *et al.* Revealing the microbiota of market edible insects through PCR-DGGE, metagenomic sequencing and real-time PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 276, p. 54-62, 2018b. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.013>

OSIMANI, A., *et al.* The bacterial biota of laboratory-reared edible mealworms (*Tenebrio molitor* L.): From feed to frass. **International Journal of Food Microbiology**, v.272, p. 49-60, 2018a. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.001>

PARK, J.Y., *et al.* Biodiesel production from the black soldier fly larvae grown on food waste and its fuel property characterization as a potential transportation fuel. **Environmental Engineering Research**, v. 27, n. 03, 2022. <https://doi.org/10.4491/eer.2020.704>

PRIYADARSHINI, A., *et al.* Emerging food processing technologies and factors impacting their industrial adoption. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, p. 3082-3101, 2019. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1483890>

PYETT, S., *et al.* **Our future proteins: a diversity of perspectives**. Amsterdam: VU University Press, 575p., 2023.

RAIMONDI, S., *et al.* Effect of rearing temperature on growth and microbiota composition of *Hermetia illucens*. **Microorganisms**, v.08, n. 902, 2020. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060902>

RAMASHIA, S. E., *et al.* Microbiological quality of different dried insects sold at Thohoyandou open market, South Africa. **Food Research**, 2020

RUMPOLD, B. A.; SCHLUTER, O. K. Nutritional composition and safety aspects of edible insects. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 57, n. 05, 2013. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200735>

SÁNCHEZ-MUROS, M. J.; BARROSO, F. G.; MANZANO-AGUGLIARO, F. Insect meal as renewable source of food for animal feeding: a review. **Journal of Cleaner Production**, v. 65, p. 16-27, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.11.068>

SAUCIER, L., *et al.* Comparison of black soldier fly larvae pre-treatments and drying techniques on the microbial load and physico-chemical characteristics. **Journal of Insects as Food and Feed**, v. 08, n. 01, p.45-64, 2022. <https://doi.org/10.3920/JIFF2021.0002>

SEARCHINGER, T., *et al.* Creating a sustainable food future: a menu of solutions to feed nearly 10 billion people by 2050. **World Resources Institute**, 556p., 2019

SINGER, R. S., *et al.* Modeling the relationship between food animal health and human foodborne illness. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 79, n. 2-4, p. 186-203, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2006.12.003>.

SINGH, A.; SRIKANTH, B. H.; KUMARI, K. Determining the black soldier fly larvae performance for plant-based food waste reduction and the effect on biomass yield. **Waste Management**, v. 130, p.147-154. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2021.05.028>

SKOTNICKA, M., *et al.* Possibilities of the development of edible insect-based foods in Europe. **Foods**, v. 10, n. 4, 2021. <https://doi.org/10.3390/foods10040766>

SSEPUUYA, G., *et al.* Effect of processing, packaging and storage-temperature based hurdles on the shelf stability of sautéed ready-to-eat *Ruspolia nitidula*. **Journal of Insects as Food and Feed**, v. 02, n. 04, p.245-253, 2016. <https://doi.org/10.3920/JIFF2016.0006>

STOOPS, J., *et al.* Minced meat-like products from mealworm larvae (*Tenebrio molitor* and *Alphitobius diaperinus*): microbial dynamics during production and storage. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.41, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2017.02.001>

STULL, V. J. Impacts of insect consumption on human health. **Journal of Insects as Food and Feed**, v. 07, n. 05, p. 695-713, 2021. <https://doi.org/10.3920/JIFF2020.0115>

SWITAJ, T. L.; WINTER, K. L.; CHRISTENSEN, S. R. Diagnosis and management of foodborne illness. **American Family Physician**, v. 92, n. 5, p. 358-365, 2015.

TOMBERLIN, J. K.; SHEPPARD, D. C. Factors influencing mating and oviposition of black soldier flies (Diptera: Stratiomyidae) in a Colony. **Journal of Entomological Science**, v. 37, n. 07, 2002, p. 345-352. <https://doi.org/10.18474/0749-8004-37.4.345>

TZOMPA-SOSA, D. A., *et al.* Insect lipid profile: aqueous versus organic solvent-based extraction methods. **Food Research International**, v. 62, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.052>

UNITED NATIONS. World Population Prospects 2019: highlights (ST/ESA/SER.A/423). Department of Economic and Social Affairs, Population Division. New York, UN. 46 p., 2019

VANDEWEYER, D., *et al.* Biological contaminants in insects as food and feed. **Journal of Insects as Food and Feed**, v. 07, n. 05, p. 807 – 822, 2021. <https://doi.org/10.3920/JIFF2020.0060>

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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.07.011>

VAN HUIS, A. Edible insects contributing to food security? **Agriculture & Food Security**, v. 04, n. 20, 2015. <https://doi.org/10.1186/s40066-015-0041-5>

VAN HUIS, A., *et al.* **Edible insects: future prospects for food and feed security**. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013. 187 p.

VAN HUIS, A. Insects as food and feed, a new emerging agricultural sector: a review. **Journal of Insects as Food and Feed**, v. 06, n. 01, 2020. <https://doi.org/10.3920/JIFF2019.0017>

VAN HUIS, A. Potential of insects as food and feed in assuring food security. **Annual Review of Entomology**, v. 58, n. 01, 2013. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153704>

VARELAS, V. Food wastes as a potential new source for edible insect mass production for food and feed: A review. **Fermentation**, v. 05, n. 81, 2019, <https://doi.org/10.3390/fermentation5030081>

WADE, M.; HOELLE, J. A review of edible insect industrialization: scales of production and implications for sustainability. **Environmental Research Letters**, v. 15, n. 12, 2020. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/aba1c1>

WANG, Y. S.; SHELOMI, M. Review of black soldier fly (*Hermetia illucens*) as animal feed and human food. **Foods**, v. 6, n. 91, 2017. <https://doi.org/10.3390/foods6100091>

WORLD HEALTH ORGANIZATION; FOOD AND ANGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; UNITED NATIONS UNIVERSITY – Report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation. **Protein and amino acid requirements in human nutrition**. World Health Organization technical report series, n. 935, 265 p., 2007

WYNANTS, E., *et al.* Effect of post-harvest starvation and rinsing on the microbial numbers and the bacterial community composition of mealworm larvae (*Tenebrio molitor*). **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 42, p. 8-15, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.06.004>

YAN, X., *et al.* Quality of *Tenebrio molitor* powders: effects of four processes on microbiological quality and physicochemical factors. **Foods**, v. 12, n. 572, 2023. <https://doi.org/10.3390/foods12030572>

YEN, A.L. Insects as food and feed in the Asia Pacific region: current perspectives and future directions. **Journal of Insects as Food and Feed**, v. 01, n. 01, p. 33-55, 2015. <https://doi.org/10.3920/JIFF2014.0017>

ZULKIFLI, N.F.N.M., *et al.* Nutritional value of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae processed by different methods. **PLoS ONE**, v. 17, n. 02, 2022. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0263924>