



ENTOMOPHAGY
THE PRACTICE OF EATING BUGS

Estudo do potencial dos insetos comestíveis para aplicação na indústria alimentar

José Carlos Reis Ribeiro
Mestrado em Bioquímica

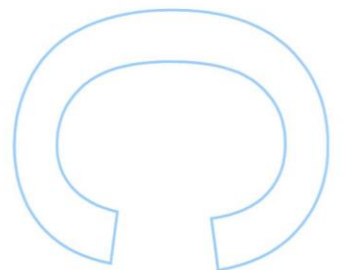
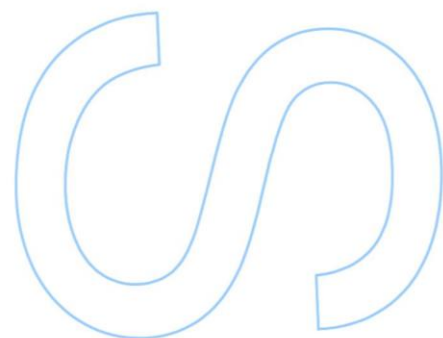
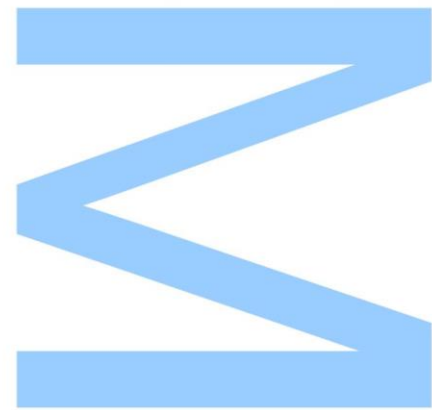
Departamento de Química e Bioquímica
2017

Orientador

Doutor Luís Miguel Cunha, Professor Associado
(GreenUP, DGAOT-FCUP)

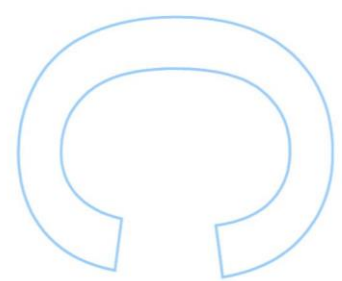
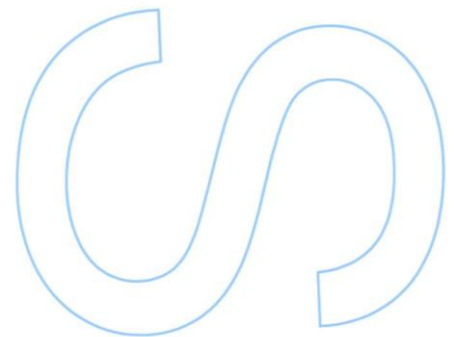
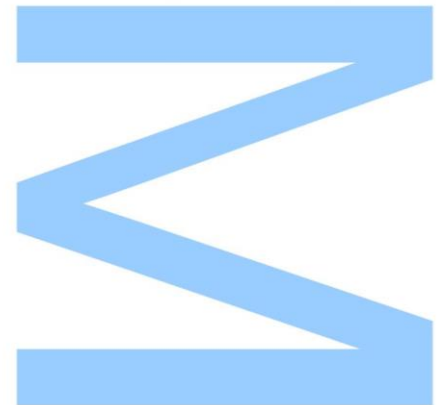
Coorientadora

Doutora Ana Rita Cabrita, Professora Auxiliar
(LAQV/REQUIMTE/ICBAS/UP)





Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.
O Presidente do Júri,
Porto, ____/____/____



Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto e Instituto Ciências Biomédicas Abel Salazar, instituições que me acolheram não só durante a realização deste projeto, mas também durante todo o meu percurso académico.

Gostaria de agradecer ao meu orientador Professor Doutor Luís Miguel Cunha e coorientadora Professora Doutora Rita Cabrita, por todo o apoio que me deram durante a realização deste projeto e por todas as oportunidades que me proporcionaram para enriquecer este projeto e o meu percurso académico.

Ao Professor João Fonseca e Doutor Bernardo Sousa-Pinto (MEDCIDS/CINTESIS/FMUP) pelos seus contributos para a planificação e elaboração do artigo de revisão, pois sem o seu conhecimento teria sido impossível completar essa etapa do projeto.

À Frulact, e em especial à Eng.^a Cândida Miranda por me terem proporcionado a hipótese de realizar o estágio na empresa e pelo interesse demonstrado no tema. Em particular, gostaria de agradecer à Dra. Cristina Rodrigues, Vítor Alves e Luís Paulico pela disponibilidade que demonstraram em ajudar-me a realizar o estágio na Frulact

À Professora Margarida Maia (ICBAS/LAQV-REQUIMTE) pela ajuda preciosa que deu na elaboração deste documento e realização dos trabalhos práticos e à Sílvia pela paciência para aguentar com as minhas asneiras e pela boa-disposição que sempre contagiava o laboratório.

À Sense Test pela oportunidade concedida para realização das provas sensoriais.

Ao Guilherme Pereira por todo o interesse demonstrado neste projeto e por todo o conhecimento que forneceu sobre o tema de insetos para alimentação humana.

Aos meus Pais por em terem apoiado em todas as minhas decisões e por toda a compreensão que demonstraram nestes anos, em especial neste último ano de realização do projeto.

E por último, um agradecimento sentido à minha namorada por me ter acompanhado nestes últimos cinco anos e pela sua ajuda e apoio incondicional que foram fatores determinantes para ter concluído esta etapa.

Resumo

Devido ao crescimento expectável da população mundial e alterações nos hábitos alimentares, os níveis de produção e consumo de carnes irão aumentar drasticamente nas próximas décadas. Isto vai provocar um agravamento dos efeitos nefastos ambientais, económicos e de saúde que a produção e consumo de carne apresentam atualmente. Também é necessário ter em consideração que as atuais praticas agrícolas não serão capazes de satisfazer a crescente procura de alimentos. Assim, são necessárias alternativas a este paradigma, estando a ser equacionado o uso de fontes nutricionais alternativas que garantam a sustentabilidade ambiental, como é o caso dos insetos. Estes são consumidos tradicionalmente em várias regiões do mundo, sendo historicamente marginalizados no ocidente. Para que o seu consumo se enraíze, será preciso ultrapassar barreiras de segurança alimentar e aceitação dos consumidores.

O projeto desenvolvido procurou aprofundar o conhecimento do potencial dos insetos na industria alimentar, estando dividido em três partes distintas. Na primeira, foi desenvolvida uma revisão sistemática sobre o perigo alergénico do consumo de insetos, sendo identificados dois grupos de risco: indivíduos alérgicos a crustáceos e indivíduos constantemente expostos a insetos.

Numa segunda parte, foi desenvolvido um trabalho laboratorial onde se analisou nutricionalmente duas espécies de grilo, *Acheta domesticus* e *Gryllodes sigillatus*, e se procurou otimizar técnicas de extração lipídica e proteica. A análise nutricional dos grilos confirmou o elevado teor proteico e de micronutrientes como P, Cu, Fe e Zn. As extrações lipídicas foram realizadas com o método de Soxhlet testando cinco solventes orgânicos, sendo o etanol aquele que proporcionou melhores extrações da fração lipídica (resultados confirmados pelo método de Folch). Em adição, o impacto sensorial da desengorduração foi avaliado com a elaboração de barras de cereais e frutos secos, incorporando insetos inteiros moídos e insetos desengordurados. Na prova sensorial realizada, utilizaram-se testes CATA (Check-All-That-Apply) e testes de aceitação e intenção de comer recorrendo a escalas hedónicas de nove valores. Os resultados confirmaram que a desengorduração teve um impacto positivo nas propriedades sensoriais dos insetos.

Por último, foi realizado um projeto em parceria com a Frulact, empresa da área alimentar, com o intuito de testar a incorporação de diferentes espécies de inseto em produtos alimentares. Foram testadas duas formas diferentes de incorporação de insetos: uma com farinha de larva *Alphitobius diaperinus* e outra com farinha de duas

espécies de grilo *A. domesticus* e *G. sigillatus*. Os produtos elaborados consistiam em preparados de fruta e cereais/frutos secos que seriam depois adicionados a 20% a um iogurte Mimosa natural. Os produtos foram avaliados sensorialmente, tendo os produtos com *A. diaperinus* melhores resultados, apesar da textura ter uma avaliação negativa. Além disso, foram realizadas análises microbiológicas tendo tanto os insetos como os preparados cargas microbiológicas que ultrapassavam os limites impostos pela empresa.

Assim, neste projeto foi possível identificar problemas associados à segurança alimentar dos insetos (nomeadamente identificando grupos de risco para desenvolvimento de reações alérgicas e cargas microbiológicas elevadas nos produtos incorporando a espécie *A. diaperinus*) e também aprofundar o conhecimento relativo ao desenvolvimento de produtos com incorporação de insetos ao verificar o impacto sensorial positivo da desengorduração dos insetos.

Palavras-chave: *A. diaperinus*, *A. domesticus*, aceitação, alergenicidade, arginina cinase, crustáceos, entomofagia, extração lipídica, insetos edíveis, *G. sigillatus*, propriedades sensoriais, proteína, sabor, segurança alimentar, tropomiosina

Abstract

Due to the expected growth in world population and changes in dietary habits, the levels of production and consumption of meat will rise in the next decades. This will worsen the nefarious effects on the environment, economy and health that are already associated with meat consumption and production. It is also necessary to have in mind that current agricultural techniques will not be sufficient to answer to the growing need for food. This makes it imperative to find solutions to this problem, and alternative food sources who can guarantee nutritional requirements and environmental sustainability (like insects) are being considered as one. Insects are traditionally consumed in several regions of the world but are historically marginalized in the West. In order for its consumption to gain a place in Western society it is necessary to overcome barriers related to food security and consumer acceptance.

The goal of this project was to deepen the knowledge about the potential of insects in the food industry, and it is divided in three distinct parts. On the first one, a systematic review about the allergenic risks of consuming edible insects was conducted, with two major group risks being identified: crustacean-allergic patients and people who are constantly exposed to insects.

In the second part, the nutritional content of two cricket species (*Acheta domesticus* and *Gryllodes sigillatus*) was evaluated, and protein and lipid extraction processes were optimized. The nutritional analysis of the crickets confirmed their high protein content as well as micronutrients P, Cu, Fe and Zn. The lipid extractions were performed with the Soxhlet method with five different organic solvents being tested, and ethanol was the one who extracted the most lipids (results confirmed by Folch method). In addition, the sensorial impact of defatting was evaluated with the elaboration of protein bars with incorporation of both whole ground and defatted crickets. On the sensory analysis performed, CATA (Check-All-That-Apply) tests were utilized and acceptance and willingness to eat were evaluated with hedonic scale of nine points. The results confirmed that defatting had a positive impact on sensory properties of insects.

Finally, a project was carried out in partnership with Frulact, a company on the food business, with the goal of incorporating different species of insects on food products. Two ways of incorporating were tested: one with flour of larvae of *Alphitobius diaperinus* and another with flour of two cricket species *A. domesticus* and *G. sigillatus*. The elaborated products consisted of fruit and cereals preps, which would be added at 20% to a natural yoghurt. The products sensory properties were evaluated, with the ones

incorporating *A. diaperinus* having the better results, although texture had a negative evaluation. Furthermore, a microbiological analysis of both insects and food products was performed and the microbiological load surpassed the limits imposed by the company.

Therefore, in this project it was possible to identify problems associated with food security of insects (in particular, identifying two risk groups for the development of allergic reactions and with the microbial counts of products incorporating *Alphitobius diaperinus* being generally high) but also to deepen the knowledge about product development with insect defatting to result in improved sensorial properties of insects.

Keywords: *A. diaperinus*, *A. domesticus*, acceptance, allergenicity, arginine kinase, crustaceans, edible insects, entomophagy, flavour, food safety, *G. sigillatus*, lipid extraction, sensorial properties, protein, tropomyosin

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo	ii
Abstract	iv
Índice.....	1
Lista de Figuras	5
Lista de Tabelas	7
Lista de Abreviaturas	8
1.Introdução.....	9
1.1. Procura por novas fontes alimentares	9
1.2. Consumo tradicional de insetos.....	10
1.3. Entomofagia no Ocidente	11
1.4. Vantagens do consumo de insetos.....	12
1.4.1. Valor nutricional	12
Macronutrientes	13
Aminoácidos	14
Ácidos Gordos.....	15
Minerais e vitaminas.....	16
1.4.2. Impacto ambiental.....	17
1.5. Barreiras à implementação de entomofagia	18
1.5.1. Situação legal	18
1.5.2. Segurança alimentar	19
Bactérias	20
Vírus	20
Priões.....	21
Riscos alergénicos	21
Outros riscos químicos.....	22
1.5.3. Aceitação do consumidor.....	23

2. Objetivos.....	26
Parte A – Revisão sistemática sobre risco alergénico do consumo de insetos.....	27
3. Materiais e métodos.....	27
3.1. Critérios de inclusão e exclusão	27
3.2. Seleção dos estudos e recolha de informação	28
4. Resultados.....	28
4.1. Reatividade cruzada/co-sensitização e deteção de alergénios.....	29
4.2. Relatórios de casos, séries de casos e estudos de prevalência	32
4.2.1. Estudos de prevalência.....	33
4.2.2. Relatórios de casos e séries de casos	33
5. Discussão e conclusão	37
Parte B – Estudo do perfil nutricional de insetos e avaliação de processos de extração lipídica e proteica.....	41
6. Material e métodos	41
6.1. Insetos	41
6.2. Composição química	41
6.2.1. Matéria seca e cinza	41
6.2.2. Proteína bruta	42
6.2.3. Gordura bruta	44
6.2.4. Fibra bruta	45
6.2.5. Quitina	46
6.2.5.1 Fibra de detergente ácido (ADF)	46
6.2.5.2 ADIN	47
6.2.6. Análise composição em minerais	48
6.3. Extração da fração lipídica dos insetos	49
6.3.1 Método de Soxhlet.....	49
6.3.2. Método de Folch	50
6.4. Extração proteica	51
6.5. Análise estatística	52

6.6. Análise sensorial de barras proteicas com incorporação de insetos inteiros e extratos desengordurados.....	52
6.6.1 Elaboração das barras.....	52
6.6.2. Prova sensorial.....	54
6.6.3 Análise estatística.....	56
7. Resultados.....	57
7.1. Composição química e teores em minerais.....	57
7.2. Extração lipídica.....	58
7.3. Extração proteica.....	60
7.4. Provas sensoriais.....	62
8. Discussão.....	64
Parte C – Projeto desenvolvido em parceria com a FRULACT sobre o potencial da aplicação de insetos na indústria alimentar.....	67
9. Material e métodos.....	67
9.1. Elaboração de preparados de fruta e cereais/frutos secos com incorporação de farinha de insetos.....	67
9.2. Provas sensoriais.....	68
9.3. Análise Microbiológica.....	68
9.3.1. Matérias primas.....	68
9.3.1.1. Quantificação de mesófilos totais e fungos filamentosos.....	69
9.3.1.2. Quantificação de bactérias formadoras de esporos.....	69
9.3.2 Preparados.....	70
9.4 Análise estatística.....	70
10. Resultados.....	70
10.1. Elaboração de produtos.....	70
10.2. Avaliação sensorial dos produtos com incorporação de insetos.....	72
10.2.1 Aparência.....	72
10.2.2 Aroma.....	73
10.2.3 Sabor.....	74

10.2.4 Textura	75
10.2.5. Apreciação global	75
10.2.6. Atitude de compra	76
10.2.7. Doçura	77
10.3. Comparação sensorial entre produtos com incorporação de insetos e produtos análogos sem incorporação de insetos	77
10.4. Análise microbiológica	80
10.4.1 Matérias-primas	80
10.4.2 Preparados	82
11. Discussão	84
12. Conclusão geral	88
13. Disseminação dos resultados	89
14. Referências bibliográficas	90
15. Anexos.....	105
Anexo 1. Modelo da ficha sensorial utilizada para avaliação das barras de cereais e frutos secos.....	105
Anexo 2. Modelo da ficha sensorial utilizada para caracterização de produto ideal.	107
Anexo 3. Modelo da ficha sensorial utilizada para avaliação dos produtos elaborados na Frulact.....	108

Lista de Figuras

Fig. 1 - Diagrama de inclusão/exclusão dos artigos.	28
Fig. 2 - Exemplo das barras utilizadas na prova sensorial.	54
Fig. 3 - Exemplo de cabine para realização de prova sensorial.	56
Fig. 4 - Teor em Gordura Bruta (% MS) resultante das extrações lipídicas realizadas com o método de Soxhlet para a espécie <i>A. domesticus</i> (A) e <i>G. sigillatus</i> (B).....	59
Fig. 5 - Teor em lípidos totais (% MS), resultantes das extrações lipídicas realizadas com o método de Folch, para os resíduos desengordurados com o método de Soxhlet para as espécies <i>A. domesticus</i> (A) e <i>G. sigillatus</i> (B).....	59
Fig. 6 - Proporção de PB total da amostra presente em cada uma das frações obtidas durante o processo de extração lipídica.....	60
Fig. 7 - Teor em PB (%MS) de cada uma das frações obtidas durante o processo de extração proteica.	61
Fig. 8 - Representação gráfica das avaliações de aceitação global e intenção de comer (<i>Food Action Scale</i>) dos diferentes produtos testados.	62
Fig. 9 - Análise de correspondência de frequência CATA para percepções sensoriais.	63
Fig. 10 - Análise de correspondência de frequência CATA baseado na tabela de contingências, contendo apenas atributos que influenciam significativamente os produtos, com sobreposição de elipses de confiança a 95% para os produtos.....	64
Fig. 11 - Avaliação da aparência dos produtos com incorporação de inseto.	73
Fig. 12 - Avaliação do aroma dos produtos com incorporação de inseto.....	73
Fig. 13 - Avaliação do sabor dos produtos com incorporação de inseto.....	74
Fig. 14 - Avaliação da textura dos produtos com incorporação de inseto.....	75
Fig. 15 - Avaliação da apreciação global dos produtos com incorporação de inseto... ..	76
Fig. 16 - Avaliação da atitude de compra dos produtos com incorporação de inseto ..	77
Fig. 17 - Comparação sensorial entre preparado A-L e produto análogo sem incorporação de inseto.....	78
Fig. 18 - Comparação sensorial entre preparado B1-L e produto análogo sem incorporação de inseto.....	78
Fig. 19 - Comparação sensorial entre preparado C-L e produto análogo sem incorporação de inseto.....	79
Fig. 20 - Comparação sensorial entre preparado D1-L e produto análogo sem incorporação de inseto.....	79
Fig. 21 - Comparação da atitude de compra entre produtos análogos com e sem inseto	80

Fig. 22 - Carga microbiológica das matérias-primas (espécies de inseto).....	81
Fig. 23 - Carga microbiológica das diferentes matérias-primas em termos de fungos filamentosos.	82
Fig. 24 - Carga microbiológica dos diferentes preparados elaborados em termos de mesófilos totais.	82
Fig. 25 - Carga microbiológica dos diferentes preparados elaborados em termos de bactérias formadoras de esporos aeróbias mesófilas.	83
Fig. 26 - Carga microbiológica dos diferentes preparados elaborados em termos de bactérias formadoras de esporos aeróbias termófilas.	84

Lista de Tabelas

Tabela 1. Composição nutricional (% MS) de insetos com maior potencial para serem consumidos no Ocidente.	13
Tabela 2. Teor em aminoácidos (MS) presente nos insetos com maior potencial para serem consumidos no Ocidente (mg/g proteína).....	14
Tabela 3. Teor em Ácidos Gordos (g/100 g matéria gorda) de insetos com maior potencial para serem consumidos no Ocidente.....	15
Tabela 4. Teor em minerais (mg/100 g MS) de insetos com maior potencial para serem consumidos no Ocidente..	16
Tabela 5. Teor em vitaminas (MS) de insetos com maior potencial para serem consumidos no Ocidente.	17
Tabela 6. Lista de artigos que estudaram reatividade cruzada/co-sensitização entre insetos edíveis e crustáceos/ácaros ou que detetaram alergénios em insetos edíveis.	29
Tabela 7. Lista de relatórios de casos e séries de casos de alergia alimentar a insetos. Lista organizada por artigo e com informação relativa às espécies, sintomas clínicos causados pela ingestão e outras características dos sujeitos.	35
Tabela 8. Lista de solventes utilizados na extração lipídica com respetivas temperaturas e tempos de evaporação utilizados.	49
Tabela 9. Formulações usadas para elaboração das barras.....	53
Tabela 10. Composição em matéria seca (g/100 g \pm d.p), cinza, PB, GB, FB, ADF e quitina (g/100 g MS \pm d.p) das espécies de grilo <i>Acheta domesticus</i> e <i>Grylodes sigillatus</i>	57
Tabela 11. Teor em minerais e metais (mg/100 g MS \pm d.p) presente nas espécies de grilo <i>Acheta domesticus</i> e <i>Grylodes sigillatus</i>	58
Tabela 12. Rendimento das extrações lipídicas (% de fração lipídica extraída).	60
Tabela 13. Lista dos preparados elaborados no projeto desenvolvido em parceria com a Frulact.....	70
Tabela 14. Avaliação dos parâmetros físico-químicos dos preparados elaborados no projeto desenvolvido em parceria com a Frulact.....	71
Tabela 15. Informação relativa ao número de provadores de cada produto.	72
Tabela 16. Avaliações sensoriais dos produtos com incorporação de insetos que tiveram resultados mais positivos	78

Lista de Abreviaturas

AAE – Soma de aminoácidos essenciais

AC – Arginina Cinase

ADF – Fibra de Detergente Ácido

BAT – Teste de ativação de basófilos

CATA – Check-All-That-Apply

CB – Cinza Bruta

EAST – Enzyme allergosorbent test

FAO – Food Agriculture Organization of the United Nations

FB – Fibra bruta

GADPH – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GB – Gordura bruta

GEE – Gases com Efeito de Estufa

HEX1B – Hexamerina 1B

H.C – Hidratos de carbono

MS – Matéria seca

MUFA – Ácidos gordos monoinsaturados

PB – Proteína Bruta

PODCCP – Provocação Oral Duplamente Cega Controlada com Placebo

PUFA – Ácidos gordos polinsaturados

SFA – Ácidos gordos saturados

SPT – Testes cutâneos alérgicos

VDR – Valor diário recomendado

UFA – Ácidos gordos insaturados

1.Introdução

1.1. Procura por novas fontes alimentares

A Food and Agricultural Organisation of the United Nations (FAO) prevê que até 2050 a população mundial vai atingir a marca dos 9 mil milhões e que a produção de carne vai chegar aos 410 mil milhões de kg/ano [1], o que representa um aumento de 76% face aos níveis atuais [2]. Este aumento expectável no consumo de carne irá também resultar em níveis mais elevados de procura e consumo de rações ricas em proteína [3]. Além do crescimento na população mundial, também a globalização é responsável por este aumento, pois esta leva a uma propagação de hábitos alimentares do Ocidente a países em desenvolvimento [4]. O aumento nos rendimentos e urbanização nesses países estão a levar a que ocorra uma substituição de dietas tradicionais por outras mais ricas em carne (como é o caso das dietas Ocidentais) [3, 5].

Estes indícios devem causar preocupações sérias porque os problemas associados à produção e consumo de carne serão exacerbados. Especialmente, o setor do gado tem um impacto tremendo na emissão de gases com efeito de estufa (GEE) [6] sendo responsável por cerca de 18% das emissões induzidas por humanos [7]. Se olharmos para as emissões de amónia atmosférica, responsáveis pela eutrofização de águas de superfície e acidificação de solos, estas são quase na totalidade da responsabilidade do setor agrícola com 2/3 a ser devido ao setor do gado [7, 8].

O aumento da produção de carne pode também agravar muitos dos problemas relacionados com segurança alimentar que estão ligados à produção e consumo de carne. A produção com alta-densidade de animais pode aumentar a incidência de doenças infecciosas como a gripe aviária, encefalopatia espongiiforme bovina e febre suína [9, 10], e o consumo de carnes vermelhas está associada a um aumento na mortalidade, incidência de doenças cardiovasculares e cancro colo-retal [11, 12].

Também deve ser considerado que a produção de carne (especialmente no caso do gado) é extremamente ineficiente consumindo mais proteína comestível por humanos do que aquela que produz – por cada kg de proteína animal produzida, são gastos 6 kg de proteína de origem vegetal [13, 14]. A sustentabilidade económica da produção de carne vai também ser posta em causa num futuro próximo, pois uma subida nos preços mundiais para as culturas agrícolas mais importantes irá resultar num aumento de mais de 30 % nos preços de carne de vaca, porco e aves até 2050 [15]. A possível escassez em alimentos pode ainda ficar agravada pelo aumento na procura

por biocombustíveis e decréscimo na produtividade agrícola [16], sendo claro que são precisas alternativas à produção de carne.

Com tantas preocupações relacionadas com a sustentabilidade atual e futura do consumo e produção de carne, é natural que haja um crescente sentimento de urgência para mudar os hábitos alimentares a nível mundial para uns que sejam mais sustentáveis de ponto de vista ambiental e económico e que garantam um estilo de vida saudável para gerações presentes e futuras [17]. Estratégias que apenas reduzam a produção de gado ou que apenas levem a mudanças leves nas dietas (como maior consumo de ovos, legumes ou aves) apenas vão atenuar os problemas e não os vão resolver [18]. Uma das soluções que tem gerado mais interesse é a possibilidade de utilizar novas fontes alimentares (insetos, algas, lentilhas, colza) que permitam não só garantir sustentabilidade económica e ambiental, mas também que cumpram requisitos nutricionais [19].

1.2. Consumo tradicional de insetos

O uso de insetos como alimento (entomofagia) remonta ao desenvolvimento inicial dos seres humanos, quando insetos eram consumidos abundantemente por serem facilmente colhidos [20]. Atualmente, a entomofagia é tradicionalmente praticada em mais de 100 países (principalmente na África, Ásia e América Latina) com mais de 2000 espécies (com representantes de todos os grupos) a serem consumidas [21]. Além da diversidade na quantidade de espécies que é consumida, também a fase de desenvolvimento em que os insetos são consumidos é diversificada, com insetos da ordem *Coleoptera* (compreende todos os insetos conhecidos popularmente como besouros) a serem consumidos no estado larval, enquanto insetos da ordem *Orthoptera* (como grilos e gafanhotos) são consumidos no estado adulto e insetos como o bicho da seda podem ser consumidos no estado larval ou de pupa [21].

Os motivos que levam ao consumo de insetos nos países onde essa prática é tradicional são variados: podem funcionar como fontes nutricionais complementares quando outras mais habituais estão indisponíveis [22] ou não preenchem todos os requisitos nutricionais [23], podendo também ser consumidos devido ao seu sabor [24]. O seu modo de consumo é também diverso: inicialmente eram consumidos ainda vivos [25, 26], mas começaram a ser cozinhados [26] e em alguns países têm um estatuto de comida *gourmet* [24].

Além da vantagem nutricional que apresentam, a entomofagia também é parte integral da economia em certos países sendo especialmente importante como fonte de

rendimento para pessoas que vivem na pobreza [22, 27] como na África do Sul, onde a colheita da lagarta *Imbrasia belina* é um negócio avaliado em 85 milhões de dólares [5].

Usualmente, é assumido que os insetos são consumidos em regiões cujo meio ambiente não suporte técnicas de agricultura avançadas. E de facto, os insetos são frequentemente consumidos em regiões tropicais onde a variedade no clima (húmido, deserto, monções, chuvas tropicais) pode criar áreas que não favoreçam a prática de agricultura. No entanto, o principal motivo para o consumo de insetos ocorrer nestas regiões é a sua enorme biodiversidade, garantindo que um grande número de espécies de insetos está disponível o ano todo favorecendo assim o seu consumo [28].

1.3. Entomofagia no Ocidente

Apesar do consumo histórico de insetos no Ocidente ser muito menor que noutras partes do mundo [21], existem relatos dos insetos serem consumidos de modo tradicional. Talvez o melhor exemplo deste tipo de consumo, seja o *cazu marzu*, que é um queijo de cabra tradicional da região da Sardenha que utiliza ovos de *Phiophila casei* no seu processo de amadurecimento, conferindo-lhe características organolépticas específicas. O modo de produzir este queijo foi aperfeiçoado de forma a cumprir regras de segurança alimentar e está inserido na lista de produtos tradicionais da região da Sardenha [29]. Além disso, o uso de insetos na indústria alimentar está já documentado, pois o corante carmina (E 120) é obtido a partir de cochonilhas fêmeas *Dactylopius coccus* [30].

No Ocidente, o reino animal está dividido de modo não científico em animais cujo consumo é permitido e outros (como insetos) que são considerados pragas e cujo consumo não é tolerado [31]. Existem diversas razões que ajudam a explicar a marginalização da entomofagia no Ocidente e a posição dos insetos como animais não-comestíveis [32]. A repugnância tem sido apontada como uma das principais razões para a rejeição da entomofagia no Ocidente [33], e este sentimento aparenta ser totalmente adquirido e somente explicado por razões psicológicas e não por lógica. No entanto outros fatores têm de ser considerados, como a noção que o consumo de insetos é um hábito primitivo [34] ou que apenas ocorre durante períodos de fome ou escassez de alimentos [35].

Contudo, a atitude dos países do Ocidente relativamente à entomofagia está a mudar, havendo já insetos e produtos com incorporação de insetos a serem comercializados nos mercados de países Europeus e da América do Norte. Simbolizando o crescimento da entomofagia, há registo de mais de 250 empresas ativas

[36] a nível mundial que lidam com insetos para alimentação humana ou animal. A maior parte destas são de dimensão reduzida, mas já existem algumas empresas com algum relevo no mercado, como é o caso da Proti-Farm na Holanda ou Entomo-Farms no Canadá. A maioria dos produtos que são comercializados envolvem o uso de farinha dos insetos, podendo esta ser incorporada numa enorme variedade de produtos, sendo os mais comuns as barras proteicas ou energéticas (como nos casos da Chapul ou Exo, ambas empresas dos E.U.A) e hambúrgueres, almôndegas ou panados (Essento na Suíça ou Insecta na Bélgica).

Dado que é bastante improvável que consumir insetos inteiros ou parte deles seja alguma vez totalmente aceite por consumidores Ocidentais, um foco especial tem de ser dado a técnicas de incorporação de insetos em produtos. A principal alternativa que é usada é a sua incorporação na forma de farinha ou isolados proteicos, de maneira a que os produtos não apresentem os insetos de modo visível. Empresas como a Proti-Farm, já estão a desenvolver purificados proteicos, lipídicos e de quitina para vender ao público, e na literatura científica está a surgir um aumento de interesse em técnicas de extração proteica [37-39], lipídica [40, 41] e até de gelatina [42] a partir de insetos edíveis.

Devido ao seu uso na indústria alimentar e pesquisa científica já efetuada foi possível identificar as espécies com o maior potencial para serem usadas como alimento humano na UE e outros países Ocidentais: *Acheta domesticus*, *Gryllus assimilis*, *Gryllobates sigillatus*, *Alphitobius diaperinus*, *Tenebrio molitor*, *Zophobas atratus*, *Galleria mellonella*, *Bombyx mori* e *Locusta migratoria* [19, 21, 30, 43].

1.4. Vantagens do consumo de insetos

1.4.1. Valor nutricional

Devido ao impacto do tipo de espécies, sexo, dieta, ambiente, métodos analíticos e até a preparação e processamento feitos antes do consumo, é complicado fazer avaliações gerais sobre o valor nutricional dos insetos [21]. No entanto a maioria dos insetos edíveis são fontes valiosas de proteína, lípidos e até micronutrientes [21]. De modo a poder fazer-se uma análise mais acertada sobre o valor nutricional dos insetos com mais potencial para serem consumidos no Ocidente, uma compilação baseada em informação presente na literatura científica foi efetuada.

Macronutrientes

Pela análise da tabela 1, é possível ver que a maioria dos insetos têm um teor proteico bastante elevado, com as espécies de grilo *A. domesticus* e *G. sigillatus* a terem teores proteicos acima de 65% MS. Para além deste alto teor proteico, algumas espécies de insetos também contêm um teor lipídico considerável, tendo a espécie *G. mellonella* um teor lipídico acima de 55% MS. É também visível que os valores nutricionais diferem entre as mesmas espécies, o que reflete a influência que as condições de produção e métodos utilizados para análise têm no valor nutricional dos insetos.

A fibra dos insetos é maioritariamente composta por quitina (N-acetil-D-glucosamina), [21] sendo o principal componente do exosqueleto dos insetos [44] e juntamente com o seu derivado quitosano podem ter diversas aplicações na indústria alimentar [45]. Como este elemento pode diminuir a digestibilidade da fração proteica pois alguns aminoácidos na proteína cuticular estão ligados a este componente indigestível [46, 47], até pode ser benéfico no futuro extrair a quitina como um subproduto e assim valorizar economicamente os insetos.

Tabela 1. Composição nutricional (% MS) de insetos com maior potencial para serem consumidos no Ocidente.

Espécie	Proteína (%)	Gordura (%)	Cinza (%)	Fibra (%)	H.C (%)
<i>A. diaperinus</i> [48]	60,0	29,0			
<i>A. domesticus</i> [49]	66,6	22,1	3,6	10,4	0,0
<i>A. domesticus</i> [50]	70,8	18,6	5,0	8,2	0,0
<i>B. mori</i> (larva) [49]	53,8	8,1	9,4	6,4	22,4
<i>B. mori</i> (larva) [50]	69,8	9,5	11,1	7,1	2,4
<i>B. mori</i> (pupa) [51]	52,5	19,2	4,8		
<i>B. mori</i> (pupa) [52]	52,6	29,4	6,9	6,6	4,6
<i>G. assimilis</i> [52]	59,2	34,3	4,2	3,2	
<i>G. mellonella</i> [49]	33,9	59,9	1,5	8,2	
<i>G. mellonella</i> [50]	38,8	58,6	2,2	5,1	
<i>G. mellonella</i> [52]	38,4	56,7	2,7	4,4	
<i>G. sigillatus</i> [53]	70,0	18,3	4,7	3,7	3,3
<i>L. migratoria</i> [52]	62,2	6,4	6,4	8,3	17,7
<i>T. molitor</i> [52]	50,9	36,1	3,8	4,2	5,0
<i>T. molitor</i> [54]	57,4	25,5	4,7	9,8	6,1
<i>T. molitor</i> [51]	49,8	37,1	3,5		9,6
<i>T. molitor</i> [49]	49,1	35,2	2,4	6,6	6,8
<i>T. molitor</i> [53]	52,4	24,7	3,6	2,0	17,4
<i>T. molitor</i> [55]	46,4	32,7	2,9	4,6	13,4
<i>Z. morio</i> [52]	54,3	40,3	3,6	3,6	
<i>Z. morio</i> [49]	46,8	42,0	2,4	6,4	2,4

Aminoácidos

Além de se analisar o teor proteico das amostras é também importantíssimo avaliar a sua composição em aminoácidos e digestibilidade, pois estes são os fatores que definem a qualidade da fração proteica e consequentemente o valor nutricional [56]. Relativamente aos teores em aminoácidos (tabela 2) é possível verificar que eles variam entre as diferentes espécies, com a soma de aminoácidos essenciais a variar entre 320 (larva de *B. mori* [57]) até 480 (*T. molitor* [57]) mg/g proteína. Estes valores são muito idênticos aos registados para soja (AAE de 438 mg/g proteína [38]), bovino (AAE de 475 mg/g proteína [58]) ou suínos (AAE de 453 mg/g proteína [58]) sendo inferiores ao teores em aminoácidos essenciais de galinha (508 mg/g proteína [58]) e caseína (531 mg/g proteína [38]). Na sua generalidade os insetos apresentam níveis nutricionais elevados de todos os aminoácidos essenciais, e em certas regiões o seu consumo suprime deficiências nutricionais em lisina, triptofano, leucina e lisina [21, 59].

Também a digestibilidade da fração proteica de insetos apresenta valores satisfatórios (entre 76 e 96% [60]), sendo ligeiramente inferiores aos valores verificados para ovos (95%) ou carne de vaca (98%), mas são superiores aos valores de digestibilidade de algumas frações proteicas de origem vegetal [59].

Tabela 2. Teor em aminoácidos (MS) presente nos insetos com maior potencial para serem consumidos no Ocidente (mg/g proteína). AAE – Soma dos aminoácidos essenciais.

Aminoácido	A. <i>diaperinus</i> [38]	A. <i>domesticus</i> [49]	A. <i>domesticus</i> [38]	<i>B. mori</i> (larva) [49]	<i>B. mori</i> (pupa) [52]	G. <i>mellonella</i> [49]	G. <i>mellonella</i> [52]	G. <i>sigillatus</i> [53]	T. <i>molitor</i> [49]	T. <i>molitor</i> [38]	Z. morio [49]	Z. morio [38]
Ala	66	88	81	45	95	67	42	58	82	70	73	68
Asp	83	84	73	66	128	95	72	73	81	80	80	82
Arg	54	61	65	42	77	50	38	47	52	54	49	54
Met* + Cys*	26	23	25	23	57	23	56	27	21	26	18	24
Gly	46	51	51	60	71	53	29	41	56	50	48	48
Glu	123	105	110	100	130	139	89	107	113	109	123	127
His*	34	23	21	26	28	23	12	17	32	29	30	31
Ile*	43	46	36	32	42	45	32	27	51	43	47	46
Leu*	66	100	66	53	56	88	64	58	106	73	97	71
Lys*	61	54	53	47	77	56	38	38	55	54	52	54
Phe* + Tyr*	120	81	92	60	72	100	75	91	110	100	104	111
Pro	56	56	54	34	41	68	38	54	70	66	55	56
Ser	40	50	38	37	43	75	58	40	51	44	47	42
Thr*	39	36	35	31	26	42	23	37	42	39	40	40
Trp*	12	6	9	8	10	9	7		8	12	9	14
Val*	58	52	55	41	48	48	38	47	59	61	52	63
AAE	459	421	392	320	416	435	344	342	483	437	450	454

*Aminoácido essencial

Ácidos Gordos

É possível verificar (tabela 3) que geralmente os insetos contêm um grau de insaturação de ácidos gordos elevado (superior ao que é verificado para bovinos e suínos [61]), sendo especialmente ricos em ácidos gordos polinsaturados (com exceção da espécie *G. mellonella*, o teor em PUFA é superior a 20% da matéria gorda em todas as espécies). Apesar de este alto teor em PUFA poder ser benéfico de um ponto de vista nutricional, é especialmente preocupante pois estes tipos de ácidos gordos são suscetíveis a oxidação por radicais livres causando degradação lipídica durante processos de armazenamento, cozimento ou fritura, o que pode levar ao desenvolvimento de sabores desagradáveis [62].

Relativamente ao rácio $\omega 6/\omega 3$ praticamente todas as espécies têm um valor muito elevado (com exceção dos valores verificados para *B. mori* os valores variam entre 13,82 e 38,2), algo que pode provocar vários problemas de saúde aos consumidores [63]. As exceções encontram-se em *B. mori* (tanto no estado larval como de pupa) em que as proporções se aproximaram do rácio ideal de 1-2:1 [63], sendo excelentes fontes do ácido gordo essencial α -linolénico ($\omega 3$), podendo assim apresentar vários benefícios para a saúde dos consumidores.

Tabela 3. Teor em Ácidos Gordos (g/100 g matéria gorda) de insetos com maior potencial para serem consumidos no Ocidente.

Espécie	SFA	UFA	MUFA	PUFA	SFA/UFA	$\omega 3$	$\omega 6$	$\omega 6/\omega 3$
<i>A. domesticus</i> [49]	35,8	64,3	25,0	37,8	0,56	1,0	36,9	38,2
<i>A. domesticus</i> [52]	34,4	63,6	32,2	30,7	0,54	1,5	29,1	18,6
<i>A. diaperinus</i> [52]	35,1	64,2	39,0	24,4	0,55	1,1	23,2	20,4
<i>B. mori</i> (larva) [49]	31,0	68,9	26,8	41,1	0,45	11,7	29,4	2,5
<i>B. mori</i> (pupa) [52]	29,2	50,8	8,9	41,8	0,58	31,0	10,8	0,35
<i>G. mellonella</i> [49]	36,4	63,5	54,1	7,1	0,57	0,48	6,6	13,8
<i>G. mellonella</i> [52]	37,9	60,3	52,9	7,4	0,63	0,34	7,0	21,1
<i>G. sigillatus</i> [53]	33,7	66,2	34,3	31,9	0,51	2,1	29,7	13,9
<i>T. molitor</i> [41]	24,2	75,7	43,7	29,2	0,32	1,1	28,0	24,8
<i>T. molitor</i> [49]	24,2	75,1	51,8	22,6	0,32	0,84	21,8	25,9
<i>T. molitor</i> [52]	25,3	74,5	43,2	31,3	0,34	1,6	29,7	18,4
<i>Z. morio</i> [49]	40,3	59,6	39,2	20,0	0,68	0,65	19,3	29,9

Minerais e vitaminas

Os insetos edíveis também podem ser excelentes fontes de alguns minerais (tabela 4), nomeadamente de P, Fe, Zn, Cu, Mn e Se, onde o consumo de 100 g de matéria garante os requisitos diários recomendados destes elementos. Esta abundância em Fe e Zn é particularmente importante devido às deficiências que se verificam nestes dois elementos em países em desenvolvimento [64].

Tabela 4. Teor em minerais (mg/100 g MS) de insetos com maior potencial para serem consumidos no Ocidente. VDR – Valor diário recomendado para adolescentes e adultos.

Espécie	Ca	P	Mg	Na	K	Fe	Zn	Cu	Mn	Se
<i>A. domesticus</i> [49]	132	958	109	435	1127	6,3	21,8	2,08	3,73	0,062
<i>A. domesticus</i> [65]	210	780	80			11,2	18,6	0,85	2,97	
<i>B. mori</i> (larva) [49]	102	1370	288	275	1827	9,5	17,7	2,08	2,49	0,081
<i>B. mori</i> (pupa) [51]	99	871	252			5,0	14,7	1,00	1,70	
<i>G. assimilis</i> [66]	225	3456								
<i>G. mellonella</i> [49]	59	470	76	40	533	5,0	6,1	0,92	0,31	0,027
<i>G. mellonella</i> [65]	60	1200	90			7,7	7,9	0,31	0,33	
<i>G. sigillatus</i> [53]	130		101	330	1190	4,2	13,9	4,79		
<i>L. migratoria</i> [66]	89	2852								
<i>T. molitor</i> [65]	120	1420	280			4,0	13,1	1,78	0,68	
<i>T. molitor</i> [51]	35	568	138			6,3	9,9	1,14	0,70	
<i>T. molitor</i> [49]	44	748	210	141	895	5,4	13,6	1,60	1,36	0,066
<i>T. molitor</i> [53]	41		304	57	835	3,3	11,2	1,86		
<i>T. molitor</i> [55]	43	706	203	365	948	6,7	10,4	1,30		
<i>Z. morio</i> [65]	42	563	118	113	751	3,9	8,8	0,86	10,21	0,033
<i>Z. morio</i> [49]	120	830	180			5,0	8,8	1,39	0,15	
VDR mg	1000-1300 [67]	700 [68]	220-260 [67]	1500 [68]	4700 [68]	7,5-58,8 [67]	8-11 [68]	0,9-1,3 [68]	1,8-2,3 [68]	0,026-0,036 [67]

Os insetos também podem funcionar como fontes de vitaminas (tabela 5), com o consumo de 100 g de matéria seca a conseguir suprimir os valores diários recomendados de riboflavina, ácido pantoténico, ácido fólico e biotina.

Tabela 5. Teor em vitaminas (MS) de insetos com maior potencial para serem consumidos no Ocidente. VDR – Valor diário recomendado para adolescentes e adultos

Vitamina	A. <i>domesticus</i> [49]	A. <i>domesticus</i> [65]	G. <i>mellonella</i> [49]	G. <i>mellonella</i> [65]	T. <i>molitor</i> [49]	T. <i>molitor</i> [65]	Z. <i>morio</i> [49]	Z. <i>morio</i> [65]	VDR [67]
Vitamina A (µg/100 g)	ND	24,3	ND	4,5	ND	24,3	ND	29,2	500 µg
Vitamina C (mg/100 g)	9,7		ND		3,1		2,9		45 mg
Tiamina B1 (mg/100 g)	0,13		0,6		0,6		0,1		1.1- 1.2 mg
Riboflavina B2 (mg/100 g)	11,1		1,8		2,1		1,8		1.1- 1.3 mg
Ácido pantoténico (B5) (mg/100 g)	7,5		4,9		6,9		4,6		5 mg
Niacina (B3) (mg/100 g)	12,5		9,0		10,7		7,7		14-16 mg
Piridoxina (mg/100 g)	0,7		0,3		2,1		0,8		1.3
Ácido fólico (B9) (mg/100 g)	0,5		0,1		0,4		0,2		0,4
Biotina (B7) (mg/100 g)	0,1		0,1		0,1		0,1		0,007
Vitamina B12 (mg/100 g)	0,017		ND		0,0		0,001		0,024

ND – Não detetado

1.4.2. Impacto ambiental

Além do seu valor nutricional, a criação de insetos apresenta também várias vantagens do ponto de vista da sustentabilidade ambiental: a produção de insetos usualmente criados para consumo humano ou ração de animais resulta numa menor emissão de GEE e menor produção de amónia quando comparados com a produção de carne [69]. A sua produção também requer pouca área agrícola para produzir 1 kg de proteína [70] e leva a menores gastos de água [47]. Os insetos também apresentam um rácio de conversão de ração muito mais favorável que gado e aves, sendo isto especialmente importante pois irá permitir racionar a quantidade de ração que é utilizada e assim diminuir os gastos em cereais e outras rações ricas em proteína [47].

Algumas espécies de insetos já demonstraram capacidade de converter restos orgânicos em produtos ricos em proteína [71]. Esta capacidade é particularmente útil tendo em conta que praticamente 1/3 de toda a comida produzida no mundo é desperdiçada [72], algo que tem consequências negativas na emissão de metano [73] e em países em desenvolvimento existe uma grande incapacidade em recolher e tratar os resíduos orgânicos [74].

Outra possível vantagem prende-se com a diminuição de uso de pesticidas. Um crescente uso de insetos para ração ou alimentação humana poderá reduzir o uso de pesticidas, que iria também diminuir os encargos económicos de agricultores que têm de garantir a segurança das suas produções em relação a pragas como insetos [75].

1.5. Barreiras à implementação de entomofagia

Como já foi referido anteriormente, existem diversas barreiras à introdução de entomofagia no Ocidente (e especialmente na Europa), havendo três principais limitações que têm impedido o avanço da entomofagia no Ocidente: incerteza quanto à situação legal do consumo e produção de insetos, dúvidas quanto à segurança alimentar dos insetos como ingrediente alimentar e rejeição por parte dos consumidores.

1.5.1. Situação legal

Uma das maiores barreiras à implementação da entomofagia no Ocidente é a incerteza legal (especialmente na União Europeia) relativamente à utilização de insetos na alimentação humana.

Aquando da elaboração das atuais regulações sobre segurança alimentar os insetos não eram considerados ingrediente alimentar, fazendo com que estes existissem numa situação de vazio legal relativamente à sua utilização na indústria alimentar. Atualmente, devido ao facto de a União Europeia ter considerado os insetos como *Novel Food* (por não serem consumidos em quantidade considerável em nenhum estado-membro até maio de 1997), a sua utilização como ingrediente alimentar é regulado pelo Regulamento (CE) 258/1997. O processo para a sua aprovação é bastante complexo pois não é centralizado (as aplicações para aprovação de uma *Novel Food* são feitas a um estado-membro e não diretamente à União Europeia), envolve testes de segurança alimentar dispendiosos, não tem prazos limite (podendo este processo arrastar-se durante vários anos) e a aprovação é só dada ao aplicante e não ao produto.

Vários estados-membro consideraram que os insetos não se enquadravam neste regulamento (pois apenas trata de ingredientes isolados de animais e não animais inteiros como é o caso dos insetos). Assim, vários países (como Itália e Alemanha) decidiram esperar por uma posição definitiva por parte da União Europeia proibindo a comercialização de insetos para alimentação, enquanto outros estados-membro e outros países Europeus toleram o uso de insetos na alimentação humana tendo até elaborado regulamentos nacionais, como é o caso da Bélgica, Holanda ou Suíça.

Numa tentativa de harmonizar a situação legal referente à entomofagia, a UE em 2015 aprovou um novo regulamento (Reg. (CE) 2283/2015, sendo aplicado a partir de janeiro de 2018) relativo a *Novel Food*, clarificando que os insetos inteiros estão enquadrados neste novo regulamento. Além dessa clarificação, este novo regulamento tem como objetivo simplificar os processos de aprovação ao torna-los centralizados a nível da UE e introduzindo prazos limite de forma a tornar o processo mais célere. Outra novidade introduzida pelo Reg. (CE) 2282/2015 é que existe a possibilidade de um ingrediente alimentar ser aprovado apenas comprovando o seu uso seguro e continuado durante 25 anos num país fora da UE. No entanto, ainda persistem algumas dúvidas relativamente a este novo regulamento (que ainda está a ser revisto), com a possibilidade de serem pedidos testes de segurança e de as informações dadas pelos aplicantes serem confidenciais. Este ponto é particularmente preocupante, pois pode ocorrer que empresas líderes de mercado consigam legalizar insetos, mas apenas com certas técnicas de criação que não serão públicas o que irá obrigar outras empresas a terem de garantir a segurança dos insetos com as suas técnicas.

1.5.2. Segurança alimentar

Relativamente à presença de substância perigosas em insetos, existem duas grandes fontes a considerar: produção de substâncias perigosas pelos próprios insetos, ou a contaminação a partir das rações utilizadas [19]. Devido ao perigo apresentado pela possível absorção de compostos existentes na ração, não é permitido utilizar certos substratos (estrume, restos alimentares provenientes de restaurantes ou produtos alimentares contendo carne ou peixe) pois a segurança alimentar dos insetos produzidos com este género de rações não está ainda provada [43].

Os principais perigos para a segurança alimentar dos insetos podem ser de duas origens diferentes: biológicas (bactérias, parasitas, vírus, fungos, priões) e químicos (alergénios, metais pesados, dioxinas, pesticidas, anti nutrientes, toxinas) [30, 43].

Bactérias

Devido ao seu alto teor em humidade e nutrientes os insetos apresentam um ambiente favorável para o crescimento microbiano. Estudos feitos com insetos edíveis (*Tenebrio molito*, *Acheta domesticus*, *Locusta migratoria*, *Bombyx mori*) relatam níveis altos de contagem aeróbica total, contagem anaeróbica total e *Enterobacteriaceae* [76-80]. Apesar de ser também possível isolar bactérias formadoras de esporos, a concentração de *Bacillus cereus* detetada em espécies edíveis foi sempre registada abaixo da sua concentração máxima de 5 lg UFC/g [76, 78, 79, 81, 82]. A presença de espécies patogénicas como *L. monocytogenes*, *C. perfringens*, *Salmonella* e *Vibrio* foi já estudada não sendo possível fazer a sua deteção em insetos [76, 79-82]. Apesar de este tipo de patogénico zoonóticos estarem presentes nos substratos usados como ração na criação de insetos, a sua replicação ativa não ocorre no trato intestinal dos insetos ao contrário do que acontece com, por exemplo *Salmonella* em aves ou porcos [78]. Além disso bactérias patogénicas de insetos (entomopatogénicas) são consideradas inofensivas para humanos uma vez que os hospedeiros são filogeneticamente diferentes, havendo assim um grau de tropismo tecidual bastante alto e não há relatos deste género de micro-organismos terem causado danos de saúde a humanos [30].

A limpeza do trato intestinal pode mitigar os riscos microbiológicos [57] mas não os elimina por completo [76, 78], mas para garantir a sua segurança microbiológica será sempre necessário padrões relativos à produção (tipo de substratos usados) e processamento pré-consumo (esterilização, fritura, fervura, etc) [43, 76, 78, 83, 84].

No entanto, é necessário também ter atenção às condições de armazenamento pois estas podem introduzir perigos alimentares nos insetos, como foi visto pelos casos de botulismo na Namíbia causados pelo consumo de insetos guardados em condições anaeróbicas [85].

Vírus

A maior parte dos vírus presentes em insetos são específicos para a família ou espécie e apenas são patogénicos para invertebrados e não para humanos ou outros vertebrados podendo apenas ter consequências negativas na capacidade de produção dos insetos [86]. Alguns vírus que estão presentes em insetos têm vírus próximos taxonomicamente em vertebrados, mas este não se conseguem replicar em insetos não sendo transmitidos por eles a vertebrados [43]. No entanto, ainda assim existe a possibilidade de insetos serem vetores replicativos de vírus que infetam vertebrados

(nomeadamente arbovírus), mas não existe evidência para a sua ocorrência em insetos que sejam usados para alimentação humana ou animal [43].

Parasitas

Apesar de existirem estudos que apontam para a ocorrência de parasitas em insetos e para a ligação esporádica entre doença parasitária humana e consumo de insetos –como nos casos esporádicos de infeção com Chagas após consumo acidental de insetos [87], não existe ainda informação relativa à existência de parasitas em insetos criados para consumo humano e/ou animal. Um sistema de cultivo onde as condições fossem controladas não teria nenhum dos hospedeiros necessários para que fosse possível aos parasitas completarem o seu ciclo de vida. Técnicas de processamento antes do consumo (idênticas às utilizadas para garantir segurança microbiológica) podem também garantir a inexistência de potenciais riscos parasitários [43].

Fungos

Insetos são portadores ou sensíveis a fungos entomopatogénicos que produzem toxinas específicas que causam mortalidade nos insetos [43], mas estes são geralmente seguros para humanos e outros vertebrados [88, 89]. Há também registos de insetos criados para alimentação humana e/ou animal serem portadores de fungos com potencial risco para humanos e animais [77]. Em geral, qualquer risco associado a fungos em insetos criados para consumo humano e/ou animal ou introduzido durante a criação, processamento ou armazenamento poderá ser diminuído com a adoção de medidas higiénicas durante toda a cadeia de produção [43].

Priões

Não há relatos de insetos terem genes que codifiquem priões ou proteínas relacionadas com priões, não sendo por isso expectável que os priões sejam expressos em insetos [90, 91]. Devido a isto é também extramente pouco provável que os insetos funcionem como vetores biológicos pois os priões de mamíferos não conseguem replicar-se nos insetos. No entanto, os insetos podem funcionar como vetores mecânicos de priões existentes nos substratos usados como ração. Mas se a ração utilizada for semelhantes aquela utilizada para outros animais, o risco não será maior para insetos [43].

Riscos alérgicos

A maior parte dos casos de alergias relacionadas com insetos são causadas por picadas de insetos pertencentes à ordem *Hymenoptera* (como vespas e abelhas) [98],

apesar de picadas de insetos sugadores de sangue, espinhos ou pelos venenosos e secreções de defesa poderem também desencadear reações alérgicas. Adicionalmente, insetos ou substância voláteis emanadas por eles podem também funcionar como aeroalergénios [99-101] – baratas são uma das maiores fontes de alergénios caseiros [102], e há vários relatos onde o contacto ocupacional com insetos que são usados para ração e alimentação humana (como a larvas *Tenebrio molitor* [103], grilos [104] ou gafanhotos [105]) levou a uma sensibilização específica à espécie e desenvolvimento de alergias inalantes.

Quando se estuda o potencial alergénico de novas fontes alimentares é importante também estudar as suas relações taxonómicas com fontes alergénicas já conhecidas, de modo a poder identificar potenciais grupos de risco [106]. Em relação ao consumo de insetos, o risco alergénico pode surgir devido a possíveis reações de reatividade cruzada com outros artrópodes, especialmente crustáceos (uma das maiores fontes de alergia alimentar no Ocidente [107]) e ácaros (uma das mais frequentes fontes de alergénios caseiros responsáveis pelo desenvolvimento de reações alérgicas respiratórias [108]). Insetos edíveis e crustáceos estão muito mais próximos taxonomicamente do que era assumido [109], e reatividade cruzada parece ser uma possibilidade real. De facto, reatividade cruzada ente insetos não-comestíveis (e.g. baratas) e crustáceos/ácaros já foi estudada com tropomiosina e Arginina Cinase (AC) a serem identificados com alergénios com reatividade cruzada entre artrópodes [110-114]. Assim, o risco de pacientes alérgicos a crustáceos e ácaros desenvolverem alergia alimentares ao consumo de insetos precisa de ser aprofundado.

Outros riscos químicos

As espécies de inseto, fase do desenvolvimento, métodos de produção e, especialmente o tipo de substrato escolhido como ração podem influenciar a acumulação de contaminantes em insetos [43]. De modo semelhante a outros produtos alimentares animais, insetos podem acumular produtos químicos perigosos, como metais pesados [92-94], dioxinas [95] ou retardadores de chama [96], mas estes estudos não foram realizados com insetos criados em condições controladas que cumprissem regulamentos da UE.

Um estudo realizado por Poma *et al* [97] com insetos criados na Europa e produtos alimentares com incorporação de insetos procurou avaliar os níveis de vários compostos químicos perigosos (retardadores de chamas, compostos organoclorados, dioxinas e metais), e para todas as amostras analisadas os níveis eram geralmente iguais ou mais

baixos que aqueles registados em produtos alimentares animais comuns (peixe, carne e ovos), cumprindo os níveis impostos pela União Europeia.

Relativamente à presença de toxinas, os insetos podem conter compostos naturalmente nocivos que tanto podem ser sintetizadas (produção autónoma) ou acumuladas a partir do substrato [43]. Existem diversos exemplos de insetos que utilizam toxinas como uma estratégia de sobrevivência [43], mas de momento não há registo de algum inseto que esteja listado para consumo na UE tenha capacidade de produzir substâncias tóxicas [30, 77].

1.5.3. Aceitação do consumidor

A aceitação ou rejeição de um alimento é influenciada pelas características do alimento (nomeadamente as suas propriedades sensoriais), o ambiente onde o consumidor está inserido (influências culturais, contacto com o alimento, etc) e características próprias do consumidor (traços de personalidade, estados psicológicos, etc) [115]. Sendo os insetos uma fonte alimentar desconhecida para a maioria dos consumidores Ocidentais é provável que sejam atrativos para consumidores que constantemente procuram novas aventuras alimentares, mas que sejam rejeitados por consumidores mais conservadores nas suas escolhas alimentares [115]. Esta rejeição por novas fontes alimentares (ou fontes desconhecidas para o consumidor) é definida como neofobia alimentar [116], que pode ser influenciada por vários fatores: noção que o alimento apresenta riscos de segurança alimentar ou que pode levar a más experiências sensoriais [117] ou incerteza quanto à origem do produto [118].

De acordo com estudos feitos anteriormente, a vontade de consumidores de países Ocidentais comerem insetos é bastante baixa [119-121], e uma das principais reações que estes apresentam à ideia de consumir insetos é repugnância, que é dos principais previsores da vontade de consumir insetos [33]. Este comportamento está associado à ingestão de substâncias que possam potencialmente colocar em perigo a saúde do consumidor [122] e os insetos são várias vezes associados a contaminações [33, 123]. Em vez de considerarem os insetos como sendo uma valiosa fonte nutricional, os consumidores tratam os insetos como sendo potencialmente inseguros [33] e culturalmente inapropriados [124]. Assim, informar os consumidores sobre as vantagens nutricionais e ambientais dos insetos tem-se revelado insuficiente em convencê-los a aceitarem os insetos como fonte alimentar [119, 121]. Este tipo de discurso racional não se tem revelado uma tática efetiva para causar grandes mudanças nos hábitos alimentares dos consumidores [125], e seria apenas efetiva em consumidores que já

tivessem predispostos a fazer mudanças nas suas dietas considerando os impactos ambientais e de saúde das suas escolhas alimentares [126]. Não é então surpreendente que num estudo [127] feito com consumidores que adquiriram produtos com incorporação de insetos, a maioria deles partilhava algumas características: preferência por comida orgânica, escolhas alimentares baseadas no impacto na sua saúde e nas consequências éticas (como impacto ambiental e sofrimento animal).

Outra possível tática para aumentar a vontade de consumir insetos pode ser dar um foco ao consumo tradicional de insetos em várias partes do mundo, mas é bastante improvável que mude a perceção dos consumidores relativamente à entomofagia pois os hábitos alimentares são vistos de forma muito relativista: um produto que seja delicioso numa região não significa obrigatoriamente que será vista do mesmo modo por consumidores noutra região ou cultura. No entanto informar os consumidores da enorme variedade de insetos que é consumida a nível mundial pode ajudar a que os consumidores entendam que existe uma enorme variedade sensorial entre os insetos [125].

Outra das grandes barreiras à aceitação dos consumidores é que estes têm uma expectativa negativa quanto às propriedades sensoriais dos insetos [121], associando o consumo destes a uma série de emoções negativas [128]. Existem várias alternativas que visam tornar o consumo de insetos apelativo: apresenta-los de forma processada de forma a não estarem visíveis no produto final [119, 128, 129], incorporá-los em produtos associados à cozinha *gourmet* [125] ou associá-los a sabores [130] e pratos [131] familiares. No entanto, é preciso ter especial atenção ao tipo de produto que é elaborado, pois é necessário que este seja apropriado para a incorporação da nova fonte alimentar, caso contrário será rejeitado pelos consumidores [132, 133]. Estudos já realizados com insetos [128, 134] demonstraram que os consumidores tendem a avaliar mais positivamente produtos que achem apropriados, mas que apenas produtos que sejam apropriados e apresentem boas características sensoriais serão consumidos regularmente. Atualmente, uma das estratégias implementadas é categorizar os insetos como fonte proteica animal, tentando classificá-los como substituto de carne algo que pode induzir os consumidores em erro pois esperam que este tipo de produtos tenha características idênticas à carne [135], algo que pode ser impossível de alcançar com os insetos [136].

Uma expectativa de sabor desagradável desempenha um grande papel na rejeição de novas fontes alimentares [137], e é essencial que as primeiras experiências que os consumidores tenham com insetos sejam positivas do ponto de vista sensorial,

pois se os produtos que inicialmente consumirem não tiverem um bom sabor é bastante provável que os consumidores assumam que todos os insetos irão ter um sabor igualmente desagradável [115]. É também essencial que os produtos com incorporação de insetos tenham um sabor agradável, pois este é um dos fatores-chave nas escolhas alimentares de consumidores [138], e a maioria destes não estão dispostos a abdicar de produtos que considerem saborosos por outros produtos que apresentem vantagens nutricionais ou ambientais [139, 140]. É evidente que para além de mitigar muitas das emoções negativas associadas ao consumo de insetos (repugnância, medo, insegurança, etc.) é necessário que os consumidores associem o consumo de insetos a emoções positivas (como boa experiência sensorial) de modo a aumentar a vontade de comer e introduzir os insetos na dieta regular [128].

Experiência prévia com consumo de insetos (mesmo que seja só conhecimento de entomofagia) influencia positivamente o consumo de produtos com insetos [115, 119, 129], assim como o consumo de insetos processados resulta num aumento da vontade de comer insetos inteiros [115]. Esta relação positiva entre contacto com entomofagia e vontade de comer insetos suporta a teoria que a atitude dos consumidores perante os insetos é uma questão de aversão adquirida que pode ser ultrapassado com constante exposição às propriedades alimentares (sabor, textura, aparência, aroma) dos insetos [125]. É preciso também ter em consideração que vontade de experimentar consumir insetos não se traduz necessariamente em disponibilidade para comprá-los [141] ou introduzi-los na dieta habitual [121, 142], devido ao consumo regular ser controlado por aspetos mais práticos como preço ou sabor do produto e não apenas vontade de experimentar um alimento incomum [127].

2. Objetivos

Os insetos apresentam-se como uma das mais promissoras fontes alimentares alternativas, não só devido ao seu alto valor nutricional e menor impacto ambiental, mas também por causa de um crescente interesse por parte do público em geral nesta prática. No entanto, ainda existem diversas áreas por explorar em relação à entomofagia para que esta consiga estabelecer-se na cultura Ocidental. Nomeadamente, é possível notar que ainda há incertezas quanto à segurança alimentar dos insetos, qualidade sensorial, técnicas de fracionamento e desenvolvimento de produtos. Assim, no desenvolvimento deste projeto procurou-se estudar o potencial dos insetos na indústria alimentar tratando de vários problemas identificados com segurança alimentar e desenvolvimentos de produtos inovadores.

Inicialmente, na fase inicial deste projeto procurou efetuar-se uma revisão sistemática sobre o perigo alergénico de consumir insetos edíveis.

Foi também proposto analisar nutricionalmente duas espécies de insetos e otimizar técnicas de extração lipídica e proteica avaliando o seu impacto nas propriedades sensoriais dos insetos.

Por fim, também surgiu a oportunidade de trabalhar com uma empresa da área alimentar (Frulact) no desenvolvimento de um projeto sobre o potencial de insetos como alimento humano que englobasse a elaboração de produtos alimentares (nomeadamente preparados de frutas ou cereais/frutos secos para posteriori incorporação em iogurtes) e sua caracterização sensorial e microbiológica.

Parte A – Revisão sistemática sobre risco alergénico do consumo de insetos

3. Materiais e métodos

Para a realização da revisão sistemática foi efetuada uma pesquisa bibliográfica, durante o mês de outubro de 2016, recorrendo a três diferentes bases bibliográficas digitais: PubMed/Medline, Scopus e Web of Science. Em todas as bases de pesquisa foi utilizada a mesma *query* (expressão de pesquisa): (insect OR mite* OR carmine OR cochineal OR cockroach OR arthropod OR crustacea* OR silkworm OR locust OR grasshopper OR cricket OR mealworm OR moth OR beetle) AND (allerg* OR hypersensitiv* OR anaphyla* OR crossreactiv*) AND (food OR edible OR consumption OR entomophagy OR ingesti* OR occupati* OR consum* OR eat*). Não foram aplicadas quaisquer restrições baseadas na data de publicação ou idioma do artigo.

Adicionalmente, também foi feito uma análise às referências dos estudos incluídos e de artigos de revisão sobre entomofagia de modo a identificar outros estudos potencialmente relevantes que não estivessem presentes em nenhuma das bases bibliográficas utilizadas.

3.1. Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos artigos originais que estudaram reatividade cruzada ou co-sensibilização entre insetos, crustáceos e ácaros (especialmente ácaros do pó de casas). Artigos que identificaram e caracterizaram alergénios de insetos edíveis também foram incluídos. Adicionalmente, foram também incluídos relatos de casos e séries de casos descrevendo reações alérgicas após o consumo de insetos, assim como estudos que avaliaram a prevalência deste tipo de reações.

Foram excluídos artigos que se focavam na deteção de alergénios em insetos sem potencial para serem consumidos na União Europeia (como por exemplo baratas). Também foram excluídos artigos que apenas estudaram alergias inalantes a insetos, assim como reações alérgicas devido a picadas, venenos ou produtos derivados de insetos (como mel, seda ou carmina).

3.2. Seleção dos estudos e recolha de informação

A triagem dos artigos obtidos a partir da pesquisa bibliográfica foi feita por dois autores de modo independente, através da leitura do título e resumo. Os textos integrais dos estudos selecionados foram analisados por dois autores de modo independente. Dos estudos selecionados após leitura do texto integral, foi recolhida informação sobre o ano de publicação, desenho experimental do estudo, espécies de insetos, alergénios e reatividades cruzadas estudadas e principais conclusões. Qualquer desacordo existente foi resolvido por consenso.

4. Resultados

Um total de 8186 artigos foram obtidos a partir da pesquisa bibliográfica e, depois de os duplicados entre as diferentes bases de dados serem removidos, 4793 artigos foram selecionados para leitura do título e resumo. Depois dessa análise inicial, 233 artigos foram escolhidos para leitura do seu texto integral, dos quais 24 foram incluídos nesta revisão sistemática. Um artigo identificado em artigos de revisão sobre entomofagia (que não estava presente em nenhuma das bases de dados utilizadas) foi também incluído (Fig. 1).

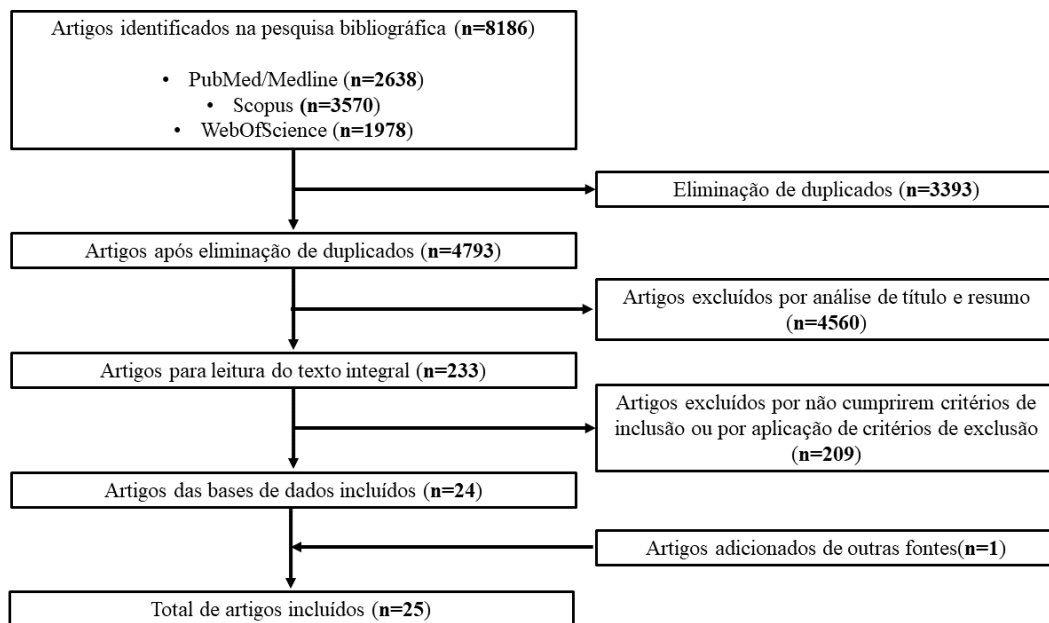


Fig. 1 - Diagrama de inclusão/exclusão dos artigos.

Dos vinte e cinco artigos analisados, oito estudaram a reatividade cruzada/co-sensibilização entre insetos edíveis, crustáceos e ácaros [143-150] três identificaram e caracterizam alergénios em insetos edíveis [151-153], dez eram relatórios de casos ou

séries de casos de reações alérgicas causadas pelo consumo intencional de insetos (oito relatórios de casos [154-161] e duas séries de casos [162, 163]), três avaliaram a frequência de reações anafiláticas causadas por entomofagia [164-166] e um avaliou a prevalência de reações alérgicas em consumidores de insetos [167].

4.1. Reatividade cruzada/co-sensitização e deteção de alergénios

Os resultados dos estudos que avaliaram a reatividade cruzada/co-sensitização entre alergénios em insetos edíveis e aqueles encontrados noutros artrópodes (crustáceos e ácaros), ou que identificaram alergénios em insetos edíveis estão resumidos na tabela 6. Oito destes estudos focaram-se na reatividade cruzada/co-sensitização entre insetos com potencial para serem utilizados para consumo humano na UE e crustáceos/ácaros [143-150]. Estes estudos foram feitos com as seguintes espécies de inseto: estado larval de diferentes besouros (*Tenebrio molitor* [143, 144, 149, 150], *Alphitobius diaperinus* [149], *Zophobas atratus* [149]), grilo do campo (*Gryllus bimaculatus* [146, 148], *Gryllus campestris* [146]), grilo doméstico (*Acheta domesticus* [146]), gafanhoto de Bombay (*Patanga succinta* [147]) e gafanhoto (*Mecopoda elongata* [145]).

Tabela 6. Lista de artigos que estudaram reatividade cruzada/co-sensitização entre insetos edíveis e crustáceos/ácaros ou que detetaram alergénios em insetos edíveis.

Espécie de inseto estudada	Agentes causadores da reação alérgica	Proteína com ligação a IgE	Características metodológicas	Artigo
<i>Tenebrio molitor</i>	Crustáceos/Der p 10 de ácaros ($n = 7$)	Tropomiosina, AC (principais) α -tubulina, β -tubulina, frutose-bifosfato aldolase, miosina de cadeia leve (secundário)	Immunoblot; Imunoprecipitação; BAT; Determinação do potencial alergénico com Allermatch; Nano LC-MS/MS	Verhoeckx, 2014 [150]
<i>Tenebrio molitor</i>	Camarão ($n = 3$ para immunoblot; $n = 15$ para SPT; $n = 12$ para BAT)	Tropomiosina AC	Processamento térmico de extratos de mealworm; SDS-PAGE; LC-MS/MS; Immunoblot; BAT; SPT	Broekman, 2015 [143]
<i>Tenebrio molitor</i>	Camarão ($n = 15$)	Tropomiosina AC	PODCCP; SPT; ImmunoCAP; BAT; Immunoblot	Broekman, 2016 [144]
<i>Tenebrio molitor</i> <i>Alphitobius diaperinus</i> <i>Zophobas atratus</i>	Crustáceos ($n = 8$ para dot-blot e $n = 6$ para immunoblot) Ácaros ($n = 11$ para dot-blot e $n = 7$ para immunoblot)	Tropomiosina, actina (Crustáceos) Paramiosina, α -amilase, HEX1B, cadeia pesada de miosina muscular (ácaros)	Processamento (fervura, fritura ou liofilizar) e digestão <i>in vitro</i> dos extratos de inseto; Immunoblot; Dot-blot; MALDI-MS/MS; Determinação do potencial alergénico com Allermatch	Van Broekhoven, 2016 [149]
<i>Gryllus bimaculatus</i>	Camarão ($n = 16$)	AC (principal) HEX1B (secundário)	SDS-PAGE; Immunoblot; LC-MS/MS	Srinroch, 2015 [148]

Espécie de inseto estudada	Agentes causadores da reação alérgica	Proteína com ligação a IgE	Características metodológicas	Artigo
<i>Patanga succinta</i>	Camarão ($n = 16$)	AC (Sem processamento) HEX1B, enolase (Sem processamento e fritura) GADPH, piruvato cinase (fritura)	Processamento térmico de extratos de <i>P. succinta</i> ; SDS-PAGE; Immunoblot; Coloração de glicoproteínas; LC-MS/MS	Phiriyangkul, 2015 [147]
<i>Mecopoda elongata</i>	Camarão ($n = 9$)	Tropomiosina	Immunoblot; Immunoblotting de inibição	Leung, 1996 [145]
<i>Gryllus bimaculatus</i> <i>Gryllus campestris</i> <i>Acheta domesticus</i>	<i>Gryllus bimaculatus</i> <i>Gryllus campestris</i> <i>Acheta domesticus</i>		EAST Inhibition com camarão e ácaro <i>Dermatophagoide pteronyssinus</i> .	Linares, 2008 [146]
Larva do bicho da seda (<i>Bombix mori</i>)	Larva do bicho da seda (<i>Bombix mori</i>) ($n = 10$)	AC	Immunoblot; Immunoblot Inhibition Assay; ELISA; ELISA Inhibition Assay	Liu, 2009 [152]
Pupa do bicho da seda (<i>Bombyx mori</i>)	Pupa do bicho da seda (<i>Bombyx mori</i>) ($n = 15$)	Glicoproteína de 27-kDa	Fervura do extrato proteico; Immunoblot; Análise proteômica; Immunoblotting de inibição; ELISA; ELISA inhibition	Jeong, 2015 [151]
Pupa do bicho da seda (<i>Bombyx mori</i>)	Pupa do bicho da seda (<i>Bombyx mori</i>) ($n = 4$)	Quitinase Paramiosina	2-DE; Western blot; Immunoblot; MALDI-TOF-MS; Análise da sequência de aminoácidos	Zhao, 2015 [153]

O papel desempenhado pela tropomiosina como um alergénio com reatividade cruzada em artrópodes foi confirmado num artigo [145]. Neste artigo, foi realizado um immunoblotting com soro de nove indivíduos com historial clínico de hipersensibilidade a camarão e extratos de insetos (incluindo o gafanhoto *M. elongata*) tendo sido detetada uma banda com peso molecular de 38/40 kDa. A reatividade cruzada foi confirmada ao realizar um immunoblot de inibição com tropomiosina recombinante de camarão.

Verhoeckx *et al* [150] demonstrou num immunoblot que soro da maioria (seis de sete) de pacientes alérgicos a crustáceos/Der p 10 (tropomiosina) de ácaros teve ligação através de IgE a extratos de *T. molitor*. Em adição, todos os pacientes testados ($n = 5$) tiveram um BAT (teste de ativação de basófilos) indireto positivo em resposta a extratos de *T. molitor*. De acordo com este estudo, as principais proteínas com reatividade cruzada foram identificadas como sendo a AC e tropomiosina, apesar de outras proteínas como α -tubulina, β -tubulina, actina, frutose-bifosfato aldolase, miosina de cadeia leve e Troponina-T terem sido também identificadas. Adicionalmente, foi previsto o potencial alergénico de proteínas de *T. molitor* usando o programa Allermatch – que considera uma proteína como potencialmente alergénica caso mostre ter mais de 35% de identidade com um alergénio conhecido num intervalo de 80 ou mais aminoácidos. Proteínas de *T. molitor* identificadas como potencialmente alergénicas foram a α -amílase, tripsina putativa, serina protéase putativa e alergénio de barata. Broekman e Verhoeckx *et al* [144] avaliaram a significância clínica da reatividade cruzada entre *T. molitor* e camarão. Neste estudo, 15 pacientes alérgicos a camarão ou camarão/ácaros

foram testados num ensaio PODCCP (Provocação Oral Duplamente Cega Controlada com Placebo) para avaliar a alergenicidade com *T. molitor* – todos os 15 pacientes eram sensíveis a *T. molitor* (SPT positivo) e 13 (87%) tiveram um PODCCP positivo em resposta ao consumo de *T. molitor*. Os autores também relataram que a maioria (14 de 15) dos pacientes reagiu quer com tropomiosina ou AC de *T. molitor* em immunoblot, e que o limite para deteção de sintomas objetivos (216 mg do extrato do inseto) foi igual ou mais baixo que a quantidade de proteína de *T. molitor* presente nos produtos alimentares presentes no mercado.

A alergenicidade da espécie *T. molitor* foi estudada em mais dois artigos [143, 149] que confirmaram que a IgE de pacientes alérgicos a ácaros ou crustáceos é capaz de se ligar a proteínas de extratos não-processados de *T. molitor* [143, 149], *Z. atratus* e *A. diaperinus* [149]. Estes dois estudos avaliaram também o efeito de métodos de processamento na alergenicidade destas espécies. De acordo com Broekman *et al* [143], o tratamento térmico alterou a solubilidade de alergénios de *T. molitor* como tropomiosina ou AC, contudo o efeito do tratamento térmico na capacidade de ligação a IgE das proteínas de *T. molitor* não foi determinado, mas este método de processamento não alterou a capacidade da IgE fazer ligações cruzadas como confirmado por SPT e BAT. Resultados similares foram também encontrados por van Broekhoven *et al* [149] que identificaram tropomiosina de *T. molitor* como sendo capaz de ter reatividade cruzada com pacientes alérgicos a crustáceos. A fervura ou digestão *in vitro* não alteraram significativamente a capacidade da tropomiosina de se ligar a IgE, mas a fritura eliminou-a. A análise da tropomiosina com Allermatch confirmou o seu potencial alergénico – todos os segmentos de 80 ou mais aminoácidos mostraram ter uma identidade igual ou superior a 35% com tropomiosinas alergénicas. A tropomiosina de *T. molitor* também teve uma grande homologia de sequência de aminoácidos (60-85%) com tropomiosinas de outros artrópodes. Os autores [149] também realizaram testes com soro de pacientes alérgicos a ácaros, e os métodos de processamento utilizados (fervura, digestão *in vitro* e fritura) diminuíram significativamente a capacidade das proteínas identificadas (paramiosina prevista com longa forma, α -amílase, actina, proteína prevista da cutícula larval, HEX1B e miosina muscular de cadeia pesada) se ligarem a IgE. Phiriyangkul *et al* [147] avaliaram, também, o efeito do processamento térmico na alergenicidade de um inseto edível (*P. succinta*) ao usar amostra compósita de soro de 16 pacientes alérgicos a camarão. Como nos estudos realizados com *T. molitor* [143, 149], o processamento térmico não eliminou a capacidade dos alergénios identificados nos extratos de inseto em se ligarem a IgE mas alterou a intensidade e tipo de alergénios identificados. Nos extratos não-processados de *P. succinta*, AC, HEX1B

e enolase foram as proteínas identificadas que se ligaram a IgE. A fritura eliminou a capacidade de AC se ligar a IgE e diminuiu a capacidade de HEX1B e enolase. Adicionalmente, nos extratos sujeitos a fritura foi possível identificar duas novas proteínas com ligação à IgE: GADPH e piruvato cinase.

Srinroch *et al* [148] realizaram um estudo focado na alergenicidade do grilo *G. bimaculatus*, em que usando amostra compósita de soro de 16 pacientes alérgicos a camarão, identificaram AC e HEX1B no extratos de *G. bimaculatus* como proteínas com ligação à IgE. Ao analisar a intensidade das bandas das proteínas, AC foi identificada como o principal alergénio e HEX1B como um novo alergénio secundário. No entanto, um outro estudo [146] realizado com um paciente com alergia inalante a três espécies de grilos (*A. domesticus*, *G. bimaculatus* e *G. campestris*) não identificou qualquer reatividade cruzada com camarão ou com o ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* através de testes de inibição EAST.

Três estudos [151-153] realizados em indivíduos sensíveis ao bicho-da-seda, focaram-se na identificação e caracterização dos alergénios responsáveis pela alergenicidade desta espécie. Liu *et al* [152] não só identificou AC como o principal alergénio, como também revelou que este alergénio tinha reatividade cruzada com AC de baratas e uma alta homologia de sequência com ACs que têm sido associadas a alergenicidade como por exemplo a AC de camarão. Zhao *et al* [153] identificaram quitinase e paramiosina como sendo alergénios da pupa do bicho-da-seda, ao mesmo tempo que especularam se estas proteínas poderiam ter reatividade cruzada devido à sua alta homologia de sequência com os seus homólogos em ácaros. Jeong *et al* [151] focaram-se em alergénios estáveis a temperaturas altas, identificando uma glicoproteína de 27-kDa como um componente de ligação à IgE termoestável. No entanto, IgE específica à glicoproteína de 27-kDa recombinante apenas foi detetada em 5 dos 15 sujeitos alérgicos à pupa do bicho-da-seda. Adicionalmente, não foi identificada qualquer reatividade cruzada uma vez que pacientes sensibilizados a ácaros não demonstraram qualquer reatividade a esta proteína.

4.2. Relatórios de casos, séries de casos e estudos de prevalência

Relativamente a relatórios de reações alérgicas provocadas por ingestão intencional de insetos, foi possível obter três estudos que avaliaram a frequência de anafilaxia causada por entomofagia [164-166] e um estudo de prevalência de alergia em consumidores de insetos [167], oito relatórios de casos [154-161] e duas séries de casos [162, 163] (tabela 7). As espécies identificadas como causadoras das reações alérgicas

foram gafanhotos [164-166], pupa do bicho-da-seda (*Bombyx mori*) [156, 163, 164], *Cordyceps sinensis* [162], traça (*Imbrasia belina*) [157-159], larva do besouro da farinha (*T. molitor*) [154, 155], cigarras [160], pupa de abelha, larva de abelha, traça (*Clanis bilineata*) [164] e larvas do gorgulho da palmeira (*Rhynchophorus ferrugineus*) [161].

4.2.1. Estudos de prevalência

Três trabalhos [164-166] estudaram a prevalência de anafilaxia causada por entomofagia. Numa revisão [164] de 358 casos de choque anafilático causado por ingestão de alimentos publicados na literatura Chinesa, 63 (17,3%) foram causados por consumo de insetos; tendo sido gafanhotos (14%) as espécies que causaram mais reações. Outro estudo [166] realizado durante um período de dois anos num hospital de cuidados terciários na Tailândia, revelou que de 36 casos de anafilaxia induzida por comida, sete (19,4%) foram causados por consumo de gafanhotos fritos. De relevo, há que salientar que um dos pacientes com anafilaxia ao consumo de insetos fritos também teve anafilaxia ao consumo de camarão uns meses depois. Num estudo muito similar realizado num Hospital Universitário na Tailândia [165], de 24 casos de anafilaxia induzida por comida, apenas um caso (4,2%) foi causado pela ingestão de insetos fritos (de espécie não determinada).

Barenes *et al* [167] avaliaram a prevalência de alergia alimentar entre consumidores de insetos. Os autores utilizaram um questionário que possibilitava a análise das características socioeconómicas dos participantes, tipo de insetos consumidos, frequência de consumo e existência de efeitos secundários. Este estudo foi efetuado em Laos, e incluiu 1059 participantes que já anteriormente tinham consumido insetos, dos quais 81 (7,6%) relataram ter experienciado reações alérgicas após o seu consumo, ainda que não tenham existido relatos de anafilaxias severas ou fatalidades devido ao consumo de insetos. As espécies que causaram as reações alérgicas não foram identificadas, apesar de os participantes do estudo terem apontado os percevejos e gafanhotos como sendo os possíveis agentes causadores.

4.2.2. Relatórios de casos e séries de casos

A pupa do bicho-da-seda é consumida em grande escala na China e existem diversos relatórios de casos de alergia alimentar ao seu consumo, não só na China [163] como nos Estados Unidos da América (E.U.A.) [156]. Ji *et al* [163] relataram o caso de um turista Francês com historial de rinite alérgica, que ao visitar a China teve um choque anafilático ao consumir bicho-da-seda pela primeira vez. O mesmo artigo faz uma revisão de 13 casos de reações de anafilaxia severa (todos na China) devido ao

consumo da pupa de bicho-da-seda em pacientes sem historial de choques alérgicos e que consumiram pupa do bicho-da-seda pela primeira vez. Gautreau *et al* [156] relataram dois casos em simultâneo de anafilaxia após o consumo de pupa do bicho-da-seda em dois imigrantes Nepaleses nos E.U.A. Os sujeitos eram pai e filho e tinham consumido pupa do bicho-da-seda pela primeira vez, nenhum deles com antecedentes de doenças alérgicas.

A espécie *C. sinensis* utiliza a pupa do bicho-da-seda como seu hospedeiro e pode ser utilizada como alimento [162]. Cinco casos de alergia alimentar devido ao consumo de *C. sinensis* foram registados [162], com três pacientes a relatarem urticária generalizada [162]. Todos os pacientes ($n = 5$) tinham doenças alérgicas associadas como alergia respiratória ($n = 4$), urticária crónica ($n = 1$), e alergia alimentar a marisco ($n = 1$). De relevo, todos os sujeitos estavam sensibilizados à pupa do bicho-da-seda (SPT positivo) e após consumirem esta espécie desenvolveram sintomas muito semelhantes aqueles induzidos pelo consumo de *C. sinensis*. A reatividade cruzada entre estas duas espécies foi confirmada por testes ELISA de inibição competitiva. Além destes casos, só foi possível encontrar um outro caso onde um sujeito com historial de alergia alimentar a marisco desenvolveu alergia alimentar após o consumo de insetos (neste caso cigarras) [160].

Existem também relatos de três casos de alergia alimentar devido ao consumo de *I. belina*, todos eles no Botswana [157-159]. Num desses casos, o paciente tinha historial de atopia e tinha ingerido *I. belina* toda a vida sem desenvolver sintomas de alergia alimentar [159]. Nos outros dois casos, os pacientes não só tinham historial de doenças alérgicas (nomeadamente rinite e conjuntivite) mas estavam também sensibilizados a alérgenos comuns como ácaros [157, 158].

Existem três casos [154, 155] descritos de indivíduos que desenvolveram alergia alimentar à *T. molitor*, todos eles com exposição constante a essa espécie. Em dois desses casos [154], provocações orais foram realizadas com camarão e os sujeitos não demonstraram qualquer tipo de sintoma [154]. Em todos os casos, os sujeitos estavam sensibilizados a alérgenos comuns [154, 155] e em dois casos (ambos com sintomas de alergia inalante a *T. molitor*), os sujeitos estavam sensibilizados a ácaros [154, 155].

Apesar de não haver relatos de fatalidades causadas por consumo de insetos é de interesse mencionar um caso peculiar em que um paciente desenvolveu cardiomiopatia de Takotsubo (também conhecida como doença do coração partido) após uma reação anafilática causada pela ingestão de *R. ferrugineus*.

Tabela 7. Lista de relatórios de casos e séries de casos de alergia alimentar a insetos. Lista organizada por artigo e com informação relativa às espécies, sintomas clínicos causados pela ingestão e outras características dos sujeitos.

Artigo	Idade/Sexo/Nacionalidade	Espécie	Sintomas clínicos	História pessoal	Outras características
Freye, 1996 [155]	ND/ND/Americano	<i>Tenebrio molitor</i>	U, D e P (garganta, língua e palma da mão)	Regularmente exposto a <i>Zophobas morio</i> , <i>Tenebrio molitor</i> e barata germânica; Hipersensível à inalação destas espécies (brôncoespasmo, conjuntivite e rinite)	SPT positivo e IgE específica a <i>Z. morio</i> , <i>T. molitor</i> e barata germânica; teste de pele intradérmico positivo a alérgenos comuns.
Broekman, 2015 [154]	28/M/Holandês	<i>Tenebrio molitor</i>	AO,U	Produtor doméstico de <i>T. molitor</i>	PODCCP positiva a <i>T. molitor</i> ; provocação oral negativa a camarão; sensível (SPT e ImmunoCAP) a <i>T. molitor</i> .
Broekman, 2015 [154]	32/M/Holandês	<i>Tenebrio molitor</i>	AO,U	Produtor doméstico de <i>T. molitor</i> ; Alergia respiratória a <i>T. molitor</i> , ácaros e pólen de bétula.	PODCCP positiva a <i>T. molitor</i> ; provocação oral negativa a camarão; sensível (SPT, ImmunoCAP e ImmunoCAP ISAC) a <i>T. molitor</i> e ácaros.
Ji, 2008 [163]	37/M/Francês (a visitar a china)	Pupa de <i>Bombyx mori</i>	Co (boca e cara), N, I (cara), DR, H	Historial de rinite alérgica; Primeira vez que consumia pupa do bicho da seda	
Ji, 2008 [163]	21/M/Chinês	Pupa de <i>Bombyx mori</i>	P, U, I, H, Des, Inc	Sem historial de choques alérgicos; Primeira vez que consumia pupa do bicho da seda	
Ji, 2008 [163]	19/M/Chinês 37/F/Chinês 54/F/Chinês	Pupa de <i>Bombyx mori</i>	U, I, DC, H, DA, V, Dis	Sem historial de choques alérgicos; Primeira vez que consumia pupa do bicho da seda	
Ji, 2008 [163]	M/20/Chinês	Pupa de <i>Bombyx mori</i>	P, U, I, H, Des, N, Inc	Sem historial de choques alérgicos; Primeira vez que consumia pupa do bicho da seda	
Ji, 2008 [163]	5 homens: 9-46 3 mulheres: 9-46	Pupa de <i>Bombyx mori</i>	P,U,I,A,DA,V,N,D	Sem historial de choques alérgicos; Primeira vez que consumia pupa do bicho da seda	

Artigo	Idade/Sexo/Nacionalidade	Espécie	Sintomas clínicos	História pessoal	Outras características
Gautreau, 2016 [156]	M/44/Nepalês (a viver nos E.U.A)	Pupa de <i>Bombyx mori</i>	U, Cor, PS	Primeira vez que consumia pupa do bicho da seda	
Gautreau, 2016 [156]	M/18/Nepalês (a viver nos E.U.A)	Pupa de <i>Bombyx mori</i>	Cor, E (cara), U	Primeira vez que consumia pupa do bicho da seda	
Choi, 2010 [162]	F/22/Coreano	<i>Cordyceps sinensis</i>	R,C,A	Historial de rinite alérgica	Sintomas similares ao consumo de pupa do bicho da seda
Choi, 2010 [162]	M/40/Coreano	<i>Cordyceps sinensis</i>	U	Historial de rinite alérgica	Sintomas similares ao consumo de pupa do bicho da seda
Choi, 2010 [162]	F/33/Coreano	<i>Cordyceps sinensis</i>	U	Historial de urticária	Sintomas similares ao consumo de pupa do bicho da seda
Choi, 2010 [162]	M/39/Coreano	<i>Cordyceps sinensis</i>	P	Historial de rinite alérgica e asma bronquial	Sintomas similares ao consumo de pupa do bicho da seda
Choi, 2010 [162]	F/24/Coreano	<i>Cordyceps sinensis</i>	U	Historial de rinite alérgica e alergia alimentar a marisco	Sintomas similares ao consumo de pupa do bicho da seda
Kung, 2013 [158]	M/39/Botsuanês	<i>Imbrasia belina</i>	Co (garganta e palata), U	Historial de conjuntivite alérgica	SPT positivo a ácaros e <i>I. belina</i> .
Kung, 2011 [157]	M/15/Botsuanês	<i>Imbrasia belina</i>	Dis, P (palato), U, I (língua e lábios), DC	Historial de rinite alérgica e eczema infantil.	SPT positivo a árvores, terra, ácaros, ervas, barata e <i>I. belina</i>
Okezie, 2010 [159]	F/36/Botsuanês	<i>Imbrasia belina</i>	I (corpo e cara), Co (generalizado), N, EC, H	Tinha consumido <i>I. belina</i> toda a sua vida sem qualquer problema	
Yew, 2012 [161]	M/46/Chinês	<i>R. ferrugineus</i>	I (cara, braços e corpo), DR, Cardiomiopatia de Takotsubo	Primeira vez que consumia <i>R. ferrugineus</i>	

Artigo	Idade/Sexo/Nacionalidade	Espécie	Sintomas clínicos	História pessoal	Outras características
Piatt, 2005 [160]	M/45/Americano	Cigarras	U	Alergia alimentar a marisco	

F- Feminino, M- Masculino; A – Angioedema, AO – Alergia oral, C – Conjuntivite, Co – Comichão, Cor – Corado, D – Diarreia, DA – Dor abdominal, Des – Desmaiar, Dis – Dispneia, DC – Dor de cabeça, DR – Dificuldade em respirar, E – Edema, EC – Erupção cutânea, H – Hipotensão, I – Inchaço, Inc – Inconsciência, N – Náusea, P – Prurido, PS – Pele seca, R – Rinite, V – Vomitar, U – Urticária

5. Discussão e conclusão

Na revisão sistemática desenvolvida foi possível observar que todos os estudos incluídos que avaliaram a reatividade cruzada/co-sensitização entre crustáceos e insetos edíveis identificaram ou tropomiosina ou AC (pan-alergénios de artrópodes) como alergénios com reatividade cruzada. Alguns relatórios de casos e um estudo que realizou um ensaio de PODCCP (Provocação Oral Duplamente Cega Controlada com Placebo) forneceram evidência que suporta a hipótese que a reatividade cruzada entre insetos edíveis e crustáceos tem significância clínica. No entanto, ficou patente que ainda existe falta de informação sobre a alergenicidade alimentar dos insetos e o contexto clínico que favorece as reações alérgicas a insetos.

Como foi mencionado anteriormente, tropomiosina e AC têm sido descritos como pan-alergénios de artrópodes – estas moléculas são responsáveis pela reatividade cruzada entre insetos e outros artrópodes [110-114], e ambas já foram descritas e caracterizadas como alergénios de insetos (e.g. baratas) [168-170]. Os estudos realizados com insetos edíveis [143-145, 147-150] confirmaram o papel da tropomiosina e AC como alergénios com reatividade cruzada com crustáceos, apesar de outros alergénios de artrópodes (GADPH, cadeia leve de miosina, frutose-bifosfato aldolase, actina, α -tubulina e β -tubulina) terem sido identificados. Hexamerina foi também identificada como sendo um alergénio com reatividade cruzada com crustáceos em estudos realizado com as espécies *P. succinta* [147] e *G. bimaculatus* [148]. Apesar de a hexamerina não ter sido ainda caracterizada como um alergénio de crustáceos, ela pertence à mesma superfamília da hemocianina [171] que é um alergénio dos crustáceos. Em adição, a tropomiosina de *T. molitor* partilha algumas características importantes dos alergénios alimentares [172], sendo uma proteína abundante nesta espécie [173] que parece manter a sua atividade alérgica mesmo após processamento termal e desnaturação *in vitro* [143, 149]. Estas características são semelhantes às das tropomiosinas presentes em crustáceos [174, 175]. Após analisar

as tropomiosinas de *T. molitor* com Allermatch, foi possível confirmar o seu potencial alergénico uma vez que a totalidade dos segmentos da tropomiosina com 80 ou mais aminoácidos demonstraram uma identidade igual ou superior a 35% com tropomiosinas associadas a alergenicidade (incluindo tropomiosinas de camarão) [149]. As tropomiosinas identificadas também tiveram uma identidade da sequência de aminoácidos bastante alta (60-85%) com tropomiosinas de camarões [149]. Tropomiosinas em ácaros (78.5-81.7%), baratas (82.4%), mosquito (chi k 10- 78.5%), parasitas (Ani s 3 – 72.9%) e peixinho-de-prata (Lep s 1 – 67.9%) também tiveram uma identidade de sequência similar com tropomiosina de camarão Pen a 1 [176]. Linares *et al* [146] obteve resultados que podem parecer contraditórios uma vez que não detetou qualquer reatividade cruzada entre diferentes espécies de grilos e camarão/ácaro. No entanto, isto pode-se dever ao facto deste estudo ter sido realizado com um sujeito que apenas estava sensibilizado aos insetos. Além disso, o paciente não apresentou IgE específica para a tropomiosina e no immunoblot realizado não apresentou qualquer ligação com bandas de peso molecular semelhantes ao da tropomiosina, o que pode explicar a falta de reatividade cruzada. Este estudo também levanta a questão se sensibilização primária aos insetos pode levar a que haja reatividade cruzada com crustáceos. Em adição a estes estudos (realizado com pacientes alérgicos a crustáceos/ácaros), três artigos [151-153] foram incluídos nesta revisão sistemática e que utilizaram soro de pacientes alérgicos ao bicho da seda e que caracterizaram AC, quitinase, paramiosina e uma glicoproteína de 27-kDa termorresistente como alergénios importantes do bicho da seda. Estes estudos sublinham a importância de usar soro de pacientes com alergia aos insetos em estudos de identificação de alergénios, pois os alergénios responsáveis pela reatividade cruzada podem ser diferentes dos alergénios responsáveis pela sensibilização primária.

A relevância clínica da reatividade cruzada entre insetos e crustáceos é sugerida por dois casos onde sujeitos com historial de alergia a marisco também desenvolveram alergia alimentar após o consumo de cigarras [160] e chá contendo *Cordyceps sinensis* [162]. Apenas um estudo [144] realizou um ensaio de PODCCP (Provocação Oral Duplamente Cega Controlada com Placebo) com pacientes alérgicos a camarão e camarão/ácaros, e os resultados demonstram que a reatividade cruzada/co-sensibilização entre crustáceos e *T. molitor* é clinicamente relevante, uma vez que a maior parte dos pacientes (87%) desenvolveram sintomas objetivos após consumirem o inseto. Esta alta percentagem (87%) de pacientes alérgicos a camarão com sintomas após consumirem *T. molitor* é surpreendente porque para diferentes espécies de marisco o risco relatado foi de 75% [177]. É necessário ter em conta que o relativo

número baixo de participantes pode dificultar a generalização dos resultados deste estudo, e mais estudos semelhantes são necessários para confirmar estes resultados iniciais. Apesar de artigos terem relatado que pacientes alérgicos a ácaros têm a capacidade de se ligarem através de IgE a extratos de insetos [149] e de alergénios identificados no bicho da seda (quitinase e paramiosina) terem uma alta homologia de sequência com alergénios de ácaros [153], provocações orais são necessárias para determinar se esta reatividade cruzada/co-sensitização tem alguma significância clínica. Ligação a IgE ou reatividade cruzada com IgE não significa necessariamente que uma reação alérgica irá ocorrer- como é visto em casos entre alimentos relacionados na família das leguminosas [178]. Avaliar a significância clínica da reatividade cruzada/co-sensitização entre insetos e ácaros é particularmente importante pois se sujeitos sensíveis a ácaros desenvolveram alergia alimentar aos insetos, o uso deste como alimento pode ser diminuído devido à alta taxa de pessoas sensíveis a ácaros no mundo.

Tendo em conta que na maioria dos casos a reação alérgica ocorreu após consumir o inseto pela primeira vez, é possível supor que estes sujeitos estariam já sensibilizados aos insetos ou que estariam sensibilizados a crustáceos ou ácaros. De facto, é sabido que devido a reatividade cruzada entre camarão e ácaros é possível ficar co-sensibilizado a qualquer um deles sem nunca ter sido exposto [179, 180]. Reatividade cruzada entre alergénios alimentares e outros tipos de alergénios é muito comum como se vê pelo caso entre caracóis e ácaros [181-183]. Por outro lado, em três casos [154, 155], alergia alimentar a *T. molitor* ocorreu em sujeitos que estavam constantemente expostos e ficaram sensibilizados a esta espécie. O perigo de pessoas que trabalham com insetos tornarem-se hipersensíveis a eles já se encontra estabelecido [103-105], e apesar de haver diferenças entre alergia inalante e alimentar (esta ocorre com uma dose muito maior), é recomendável que se considere a hipótese que exposição constante aos insetos leve ao desenvolvimento de tanto alergia inalante como alergia alimentar. Há relatos de casos similares de sujeitos ficaram sensibilizados ao alimento através de inalação e só depois desenvolveram a alergia alimentar. Estes casos foram relatados para farinha de semente de tremoço, ovos, sementes de girassol [184] e alho [185].

Uma limitação do estudo dos riscos alergénicos de consumir insetos está relacionada com a falta de informação relativa aos casos de reações alérgicas. Esta limitação acaba por estar relacionada com o facto de a entomofagia estar espalhada principalmente na África e Ásia. Como resultado, um número substancial de reações pode nem sequer ser relatado ou podem só ser relatadas em revistas locais. Apesar de

as espécies que causaram o maior número de reações terem sido identificadas como a pupa do bicho da seda ou gafanhotos isto não significa que estas espécies tenham uma maior probabilidade de causar reações alérgicas, uma vez que o tipo de consumo (espécies, quantidade, etc) varia enormemente entre regiões e, como foi mencionado anteriormente, muitas reações podem não ser relatadas. Por exemplo, a pupa do bicho da seda é consumida em grande quantidade na China e é estimado que cada ano mais 1000 pacientes sofram reações anafiláticas após o seu consumo, com cerca de 50 a precisarem de tratamento de emergência para reações anafiláticas severas [163]. Outra limitação desta revisão é que em alguns dos estudos não continham informação essencial para compreender o contexto das reações alérgicas, particularmente o historial alergénico dos sujeitos ou sensibilização a crustáceos ou ácaros.

Apenas um artigo [167] estudou a frequência de alergia alimentar a insetos entre consumidores destes, havendo um relato de uma aparente baixa prevalência (7.6%) de reações alérgicas não correspondendo nenhuma a casos de anafilaxia severa ou fatalidade. De salientar que esta taxa de prevalência pode estar inflacionada pois os casos de alergia foram auto-relatados e poderão ter sido causadas por picadas ou veneno dos insetos. Apesar dos relatos que o consumo de insetos é responsável por 17,3% [164], 19,4% [166] ou 4,2% [165] de anafilaxia induzida por comida na China e Tailândia respetivamente, a prevalência de alergia a consumo insetos não parece ser alta uma vez que diversos estudos realizados na Ásia [186, 187] (incluindo China e Tailândia) que avaliaram a prevalência de alergia alimentar não mencionam insetos como agentes causadores de alergia alimentar. É também relevante mencionar que no futuro, mais estudos que lidam com a prevalência de alergia ao consumo de insetos são necessários, e que deveriam avaliar se os pacientes têm outras alergias alimentar ou se estão sensibilizados a crustáceos e/ou ácaros.

Em conclusão, os artigos revistos aqui parecem confirmar o risco alergénico de consumir insetos para sujeitos com alergias a crustáceos, enquanto a significância clínica da reatividade cruzada entre ácaros e insetos edíveis deve ser estabelecida. Existem também sinais que sujeitos que estão constantemente expostos a insetos (como produtores) podem também desenvolver alergia alimentar, algo que pode causar preocupação visto as perspetivas atuais de aumentar as unidades de criação de insetos para produção em massa de insetos para alimentação humana e ração. Apesar de tropomiosina e AC parecerem ser os principais alergénios com reatividade cruzada, a sua significância clínica deve ser avaliada e o seu papel estabelecido através de estudos de inibição.

Parte B – Estudo do perfil nutricional de insetos e avaliação de processos de extração lipídica e proteica

6. Material e métodos

6.1. Insetos

As espécies de insetos utilizadas neste estudo foram as espécies de grilo *Acheta domestica* e *Grylloides sigillatus*. Ambas as espécies foram adquiridas à empresa Kreca-Proti-Farm (Ermelo, Holanda), sob a forma de insetos inteiros liofilizados.

As amostras de insetos foram moídas em moinho de martelos (Retsch, Haan, Alemanha) com crivo de 4 ou de 1 mm. As amostras moídas a 1 mm foram usadas nas análises de composição química e minerais e a 4 mm para as extrações lipídicas e proteicas. Todas as amostras foram armazenadas em contentores estanques, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, até posterior utilização.

6.2. Composição química

A análise nutricional dos insetos compreendeu a determinação dos seus teores em matéria seca, cinza, proteína bruta (PB), gordura bruta (GB) e fibra bruta (FB), seguindo os métodos utilizados no Laboratório de Ciência Animal, do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto. Foi também feita uma estimativa da composição de quitina presente nas duas espécies de grilo com base no método descrito por Finke [50]. Todas as análises foram realizadas em duplicado.

Em adição o teor em minerais e metais das espécies de insetos foram quantificados recorrendo a espectroscopia de emissão e absorção atómica e ICP-MS.

6.2.1. Matéria seca e cinza

O teor em matéria seca (MS) das amostras foi determinado gravimetricamente como o resíduo remanescente após secagem, a 103 °C, em estufa de circulação de ar [188].

Pesaram-se $2,5 \pm 0,20$ g de amostra moída (P1) para uma cápsula de porcelana previamente tarada (P2), que foi então colocada numa estufa de circulação de ar a 103

$\pm 2^{\circ}\text{C}$ (Memmert, Schwabach, Alemanha) durante a noite. Após a cápsula ter arrefecido até à temperatura ambiente em exsiccador, o peso da cápsula com o resíduo de amostra seco foi registado (P3).

O teor de matéria seca (%) foi calculado como:

$$MS (\%) = \frac{(P3 - P2)}{P1} \times 100$$

onde,

P1 - peso da amostra (g);

P2 - peso da cápsula tarada (g);

P3 - peso da cápsula com resíduo de amostra seco (g).

A fração de cinza das amostras é obtida por incineração e determinada gravimetricamente como o resíduo remanescente após incineração a 500°C [188].

Para a determinação de cinza colocaram-se as cápsulas com a amostra seca numa mufla (Vulcan, Vernon Hills, IL, E.U.A) a $500 \pm 20^{\circ}\text{C}$ durante 3 horas. Após a incineração, as cápsulas arrefeceram parcialmente em estufa a $103 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos, tendo sido, depois, transferidas para o exsiccador até arrefecerem à temperatura ambiente e posteriormente pesadas (P4).

A percentagem de cinza bruta (CB) em % de MS foi calculada como:

$$CB (\% MS) = \frac{(P4 - P2)}{P1 \times \frac{MS (\%)}{100}} \times 100$$

onde,

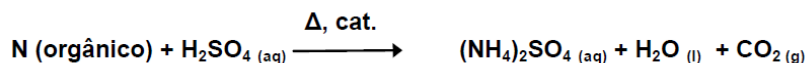
P1 - peso da amostra (g);

P2 - peso da cápsula tarada (g);

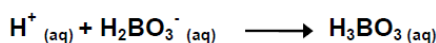
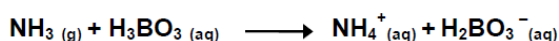
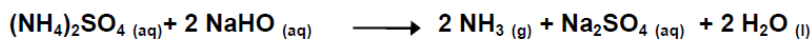
P4 - peso da cápsula com resíduo de amostra incinerada (g);

6.2.2. Proteína bruta

O teor em azoto orgânico das amostras foi determinado pelo método de Kjeldahl [189], que se baseia na digestão do azoto (N) orgânico na presença de ácido sulfúrico (H_2SO_4) e um catalisador (contendo maioritariamente sulfato de potássio) a sulfato de amónia ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$):



A adição de hidróxido de sódio (NaOH) à solução mineralizada ácida converte o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em amoníaco (NH_3) que depois de recolhido por destilação numa solução de ácido bórico (H_3BO_3) é doseado por titulação com H_2SO_4 .



Assumindo o pressuposto que as proteínas contêm 16% de N, o teor em PB é calculado como $\text{N} \times 6,25$ ($100/16$).

Para a determinação do teor em N orgânico foram pesados $0,2 \pm 0,01$ g (P1) de amostra para um tubo de digestão Kjeldahl de 100 mL e adicionados uma pastilha de catalisador Kjeldahl (PanReac AppliChem, Darmstadt, Alemanha) e 5 mL de H_2SO_4 96% (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, E.U.A). Para cada série foram também utilizados um branco (tubo sem amostra) e uma amostra de referência (bagaço de soja).

Após agitação (Vortex Genie 2, Scientific Industries, Nova Iorque, E.U.A), os tubos foram digeridos na unidade de digestão Kjeldahl (DT 208, FOSS, Hilleroed, Dinamarca), acoplada à unidade scrubber (SR210, FOSS, Hilleroed, Dinamarca) para remoção dos gases de digestão, durante 1 h a $420 \pm 20^\circ\text{C}$.

Depois de realizada a digestão das amostras e do seu arrefecimento até à temperatura ambiente, procedeu-se à sua destilação (numa unidade de destilação Kjeldahl semiautomática; VAPODEST, Gerhardt, Königswinter, Alemanha) e titulação. A destilação foi realizada com as seguintes unidades de doseamento: 25 mL de solução de NaOH (VWR International, Vila Nova de Gaia, Portugal) 40% m/v, 30 mL de solução de H_3BO_3 (Chem-Lab, Zedelgen, Bélgica) 40 % m/v (contendo verde de bromocresol 0,00001 % m/v e vermelho de metilo 0,000007 % m/v) e 40 mL de água. Após a destilação efetuou-se a titulação do destilado com uma solução padrão de H_2SO_4 0,09964 M, até se verificar a mudança de cor da solução verde para rosa.

O teor em N da amostra foi calculado como:

$$N (\%MS) = \frac{[(Va - Vb) \times M(H_2SO_4) \times 1 \times 14,007]}{(P1 \times 10 \times \frac{MS (\%)}{100})}$$

Va - volume de H₂SO₄ necessário para titular a amostra (mL);

Vb - volume de H₂SO₄ necessário para titular o branco (mL);

M (H₂SO₄) - concentração molar da solução padrão de H₂SO₄ usada na titulação (i.e., 0,0964);

1 - fator do ácido;

14,007 - peso molecular do N;

10 - conversão de mg/g para %;

P1 - peso da amostra (g); e

O teor em PB foi calculado como:

$$PB (\% MS) = N (\% MS) \times 6,25$$

6.2.3. Gordura bruta

O teor em GB foi determinado gravimetricamente após extração a quente com éter de petróleo [188].

Tratando-se de amostras de origem animal, procedeu-se à hidrólise da gordura seguida da sua extração. Resumidamente, pesaram-se 2,5 ± 0,2 g de amostra (P1) para gobelés de 600 mL, adicionaram-se 100 mL de solução de ácido clorídrico (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, E.U.A) 3 M e levou-se a fervura ligeira durante 1 h numa placa elétrica de 6 posições com sistema de circulação de água (Gerhardt, Königswinter, Alemanha). Após arrefecimento, a mistura foi filtrada por papel de filtro Whatman #1 (125 mm Ø, Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, E.U.A) para um matraz e lavada com água até o pH do filtrado ser próximo da neutralidade. O papel de filtro com o resíduo foi seco em estufa de circulação de ar a 103 ± 2°C durante 1:30 h. Depois de seco, o papel de filtro com o resíduo seco foi colocado num cartucho e coberto com algodão hidrófilo isento de gordura, tendo o cartucho sido adicionado a um copo de extração previamente tarado (P2), ao qual se adicionaram 140 mL de éter de petróleo (Chem-Lab, Zedelgen, Bélgica). A extração foi efetuada numa unidade de extração semiautomática Soxtherm (Sox 416, Gerhardt, Königswinter, Alemanha) usando o programa de extração Feed, com a duração de 1.30 h. Terminada a extração, os cartuchos foram retirados e os copos de extração secos em estufa de circulação de ar

a $103 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 2 h. Após arrefecimento no exsiccador, o peso dos copos com a gordura seca foi registado (P3).

O teor em GB foi então calculado como:

$$GB (\%MS) = \frac{(P3 - P2)}{P1 \times \frac{MS (\%)}{100}} \times 100$$

onde,

P1 - peso da amostra (g);

P2 - peso do copo de extração (g);

P3 - peso do copo com resíduo de gordura da amostra (g);

6.2.4. Fibra bruta

A FB é a porção das amostras composta por polissacáridos estruturais como a celulose e a hemicelulose e por lenhina, sendo determinada gravimetricamente após hidrólise ácida e alcalina da amostra [188].

Tendo em conta os elevados teores de GB das amostras de grilo, a determinação do teor em FB foi efetuado após pré-extração da gordura. Assim, pesou-se $1,0 \pm 0,1$ g (P1) de amostra moída para um cadinho (FOSS, Hilleroed, Dinamarca) de 30 mL com placa filtrante de 40-100 μm (porosidade 2) e procedeu-se à pré-extração da gordura com éter de petróleo (30 mL; duas vezes). Em seguida, adicionaram-se 100 mL de solução H_2SO_4 0,15 M e a amostra foi fervida durante 30 ± 1 minutos sob refluxo. Após filtração da solução ácida, o resíduo foi lavado com água quente (4 vezes) e acetona (JMGS, Odivelas, Portugal) (uma vez). A hidrólise foi repetida usando agora uma solução de hidróxido de potássio (VWR International, Vila Nova de Gaia, Portugal) (KOH) 0,23 M.

No final da digestão com H_2SO_4 e KOH, o cadinho foi colocado na estufa a $103 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 4 h e, depois de arrefecer no exsiccador, o seu peso (P2) foi registado. O cadinho com o resíduo seco foi incinerado na mufla a $500 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 2 horas, e depois de arrefecer no exsiccador o peso do cadinho com o resíduo incinerado (P3) foi registado.

O teor em FB foi calculado como:

$$FB(\%MS) = \frac{(P2 - P3)}{P1 \times \frac{MS(\%)}{100}} \times 100$$

onde,

P1 - peso da amostra (g);

P2 - peso do cadinho mais resíduo após secagem (g);

P3 - peso do cadinho mais resíduo após incineração (g);

6.2.5. Quitina

O teor em quitina das amostras de grilos foi estimado com base teórica no método descrito por Finke [50]. O teor em quitina de diferentes espécies de insetos foi calculado ajustando o valor de fibra de detergente ácido (ADF) tendo em conta o seu teor em aminoácidos. No entanto, devido à impossibilidade de analisar o teor em aminoácidos das amostras optou-se por fazer uma estimativa do teor em quitina recorrendo ao ADIN (azoto insolúvel no ADF) e por associação ao ADF-CP (proteína bruta ligada ao ADF), um processo semelhante ao que já foi utilizado para determinação de quitina em insetos [54]

6.2.5.1 Fibra de detergente ácido (ADF)

A fração ADF, constituída, maioritariamente, por celulose e lenhina, foi determinada segundo o método descrito por Robertson e Van Soest [190].

Dado o teor em gordura das amostras ser superior a 10%, realizou-se uma pré-extração da gordura. Assim, pesaram-se $1,0 \pm 0,1$ g de amostra (P1) para um cadinho previamente tarado, adicionaram-se 30 mL de acetona e filtrou-se usando vácuo (processo repetido duas vezes).

Para a determinação do teor em ADF, adicionaram-se 50 mL da solução de detergente ácido ao cadinho contendo a amostra previamente desengordurada. Após fervura durante 60 ± 1 min, filtrou-se e lavou-se o resíduo com cerca de 30 mL de água fervente (processo repetido duas vezes) e acetona (repetido uma vez). O cadinho com o resíduo foi então seco em estufa a $103 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 4 h e, depois de arrefecido no exsiccador, o seu peso foi registado (P2).

O cadinho com o resíduo seco foi depois colocado na mufla a $500 \pm 20^\circ\text{C}$ e incinerado durante 2 h. Depois de arrefecido em exsiccador, registou-se o peso do cadinho com o resíduo incinerado (P3).

A percentagem de ADF na MS foi calculada como:

$$ADF (\%MS) = \frac{P2 - P3}{P1 \times \frac{MS (\%)}{100}} \times 100$$

onde,

P1 – Peso da amostra (g);

P2 – Peso do cadinho mais resíduo do detergente ácido após secagem (g);

P3 - Peso do cadinho mais resíduo do detergente ácido após incineração (g);

6.2.5.2 ADIN

Numa primeira fase fez-se a recolha total do resíduo de ADF para um papel de filtro. Pesou-se $1,0 \pm 0,1$ g de amostra (P1) para um gobelé de 600 ml e adicionou-se 100 mL de solução de detergente ácido. Após 60 ± 1 min em fervura ligeira numa placa de aquecimento, efetuou-se a filtração da mistura para um matraz recorrendo a um filtro Whatman #54 de 125 mm Ø, previamente seco em estufa e pesado (P2). Posteriormente, lavou-se o filtro duas vezes com cerca de 30 ml de água a ferver e uma vez com acetona e colocou-se o filtro com o resíduo a secar em estufa a 103 ± 2 °C durante 3 horas. Após arrefecimento no exsicador registou-se o peso do papel de filtro com resíduo seco (P3).

O teor em N do resíduo foi determinado de acordo com o método de Kjeldahl referido anteriormente, apenas com duas diferenças. Os brancos utilizados continham um tubo com um papel de filtro, sem amostra, lavado com 100 mL de solução de detergente ácido e 60 mL de água e acetona e os tubos utilizados eram de maior dimensão o que alterou os doseamentos utilizados na destilação (51 mL de solução de NaOH, 62 mL de solução de ácido bórico e 75 mL de água).

A percentagem de N insolúvel no detergente ácido (ADIN), na MS, foi calculada como:

$$ADIN (\%MS) = \frac{[(Va - Vb) \times N(H_2SO_4) \times 1 \times 14,007]}{(P1 \times \frac{MS (\%)}{100})}$$

onde,

Va - volume de H₂SO₄ necessário para titular a amostra (mL);

Vb - volume de H₂SO₄ necessário para titular o branco (mL);

$M(H_2SO_4)$ - concentração molar da solução padrão de H_2SO_4 usada na titulação (i.e., 0,13047);

1 - fator do ácido;

14,007 - peso molecular do N;

P1 - peso da amostra (g);

O ADF-PB foi calculado utilizando o fator de conversão de N a PB de 6,25:

$$ADF - PB(\%) = ADIN (\%MS) \times 6,25$$

O teor em quitina da amostra foi calculado como a fração de ADF que não se encontra ligada a proteína:

$$Quitina (\%MS) = ADF (\%MS) \times \frac{100 - (ADF - PB (\%))}{100}$$

6.2.6. Análise composição em minerais

Para a quantificação do teor em minerais e alguns metais utilizaram-se três métodos diferentes: espectroscopia de massa por plasma acoplado indutivamente (ICP-MS), espectroscopia de absorção atômica e espectroscopia de emissão atômica. A escolha dos métodos foi feita mediante a disponibilidade do material e adequabilidade do método. As análises foram feitas em triplicado.

Para a preparação das amostras para análise, pesaram-se cerca de 0,5 g de amostra moída para frascos de teflon e adicionaram-se 3 mL de ácido nítrico 65% (Fluka-Analytical, NJ, E.U.A) e 1,5 mL de peróxido de hidrogénio 30% (Sigma-Aldrich, St.Louis, Mo, E.U.A), sendo depois feita a digestão assistida por micro-ondas (Ethos UP, Milestone, Shelton, CT, EUA). Para além das amostras de grilos foram também analisadas duas amostras referência – músculo de peixe e fígado de peixe – para utilização na análise de ICP-MS. Depois de digeridas as amostras foram diluídas num balão volumétrico de 100 mL sendo o volume completado com água ultrapura. Tanto as concentrações dos padrões a utilizar como as eventuais diluições das amostras foram feitas tendo em conta os limites de deteção dos métodos utilizados e as concentrações teóricas dos minerais e metais nas duas espécies de grilos (obtidas a partir de revisão da literatura científica). Com exceção do Na, K (emissão atômica) e Ca, Fe e Zn (absorção atômica) todos os outros elementos foram analisados por ICP-MS (Mg, Cu, Mn, Se, P, Li, V, Cr, Co, Ni, Rb, Sr, Mo, Sb, Ba, Ce, Be, As, Y, Ag, Pb, Cd, U, Tl).

6.3. Extração da fração lipídica dos insetos

6.3.1 Método de Soxhlet

O método escolhido para desengordurar as amostras de grilos foi o método de Soxhlet pois este é um método usado na indústria alimentar para extração lipídica de fontes animais e vegetais, e a sua aplicação em insetos [41] resultou em rendimentos bastante idênticos àqueles verificados com a extração de lípidos totais pelo método de Folch. Foram testados cinco solventes orgânicos (éter de petróleo, hexano, acetona, dietil éter e etanol) para inferir qual deles permitia uma melhor extração da gordura. Para cada solvente, todas as extrações foram realizadas em quadruplicado.

Foram pesadas $5,0 \pm 0,1$ g de amostra de grilo moído (P1) para um cartucho de extração (previamente seco na estufa a $103 \pm 2^\circ\text{C}$) e colocado algodão seco desengordurado sobre a amostra. Os cartuchos foram colocados no extrator Soxhlet juntamente com balões de destilação previamente secos em estufa a 50°C e pesados (P2). Após a adição de cerca de 140 mL do solvente a testar, a extração decorreu durante 6 horas em solvente em ebulição. No final, o cartucho com o resíduo de amostra desengordurada e algodão foi seco em estufa a $103 \pm 2^\circ\text{C}$ e arrefecido em exsiccador até à temperatura ambiente. O resíduo de amostra desengordurada foi armazenado protegido da luz até posterior utilização.

O solvente residual presente nos balões (contendo o resíduo de gordura da amostra) foi evaporado recorrendo a um evaporador de corrente de azoto com placa de aquecimento (Stuart, Staffordshire, Reino Unido) com variações ao nível da temperatura e tempo utilizados consoante o ponto de ebulição de cada solvente (tabela 8).

Tabela 8. Lista de solventes utilizados na extração lipídica com respetivas temperaturas e tempos de evaporação utilizados.

Solvente	Temperatura de evaporação ($^\circ\text{C}$)	Tempo de evaporação (h)
Éter de petróleo	60	2
Hexano	60	2
Acetona	60	2
Dietil éter	45	1:30
Etanol	60	3

Após evaporação do solvente, os balões foram arrefecidos em exsiccador e o seu peso registado (P3) para cálculo do rendimento da extração:

$$\text{Extrato lipídico (\%MS)} = \frac{P3 - P2}{P1 \times \frac{MS (\%)}{100}} \times 100$$

onde,

P1 - peso da amostra (g);

P2 - peso do balão de destilação (g);

P3 - peso do balão de destilação com resíduo de gordura da amostra (g);

Após análise dos resultados das extrações com diferentes solventes e do método de Folch (secção 6.3.2.), seleccionou-se o solvente a ser utilizado na obtenção de quantidade de resíduo desengordurado suficiente para incorporação em produtos alimentares (cerca de 70 g). As únicas alterações ao procedimento experimental descrito anteriormente foram a quantidade de amostra e de solvente utilizadas (cerca de 6,8 g e 190 mL, respetivamente).

6.3.2. Método de Folch

De modo a confirmar a efetividade dos solventes utilizados nas extrações com o método de Soxhlet, fez-se a análise do teor em lípidos totais das amostras de resíduo desengordurado (e também das amostras de grilo moído) através do método de Folch [191]. As amostras foram analisadas em triplicado.

Pesaram-se cerca de 0,250 g de amostra (P1) para um tubo alto, adicionaram-se 2,5 mL de metanol, agitou-se a mistura no vortex durante 10 s e colocou-se em ultra-sons durante 5 min a 30°C. De seguida foram adicionados 5 mL de diclorometano e repetiu-se a agitação no vortex e colocação nos ultra-sons. A mistura foi então centrifugada durante 15 min e retirou-se o máximo de solvente para um tubo (baixo) utilizando um filtro W#1 humedecido com diclorometano:metanol (2:1).

De seguida foram adicionados 7,5 mL de uma solução de diclorometano:metanol (2:1) ao tubo alto e os passos de agitação no vortex, colocação em ultra-sons e centrifugação foram repetidos, assim como a remoção do máximo possível de solvente para o tubo baixo. Este processo foi novamente repetido, mas desta vez com a adição de 5 mL de uma solução de diclorometano:metanol (2:1).

Adicionou-se ao tubo baixo (contendo os solventes retirados após as centrifugações) 3 mL de uma solução de cloreto de sódio 0,8 % e, após agitação em vortex, estes foram centrifugados durante 15 min. A fase inferior foi transferida para um tubo alto (previamente seco a 50 °C e pesado, P2) com o auxílio de um filtro 1PS (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, E.U.A) humedecido com diclorometano. Este processo foi repetido com a adição de 4 mL de uma solução de diclorometano:metanol:solução salina 0,8 % (86:14:1). Os tubos altos contendo a fase de solvente orgânico foram evaporados sob corrente de azoto a 45°C e, após os tubos arrefecidos em exsiccador, o seu peso registado (P3).

O teor em lípidos totais na MS foi calculado como:

$$\text{Lípidos totais (\%MS)} = \frac{P3 - P2}{P1 \times \frac{MS (\%)}{100}} \times 100$$

onde,

P1 – peso da amostra (g);

P2 – peso do tubo alto (g);

P3 – peso do tubo alto com resíduo de gordura (g);

6.4. Extração proteica

Foi também realizada uma extração proteica com o objetivo de obter um isolado proteico que pudesse ser utilizado na formulação de produtos alimentares. Para a escolha do método a realizar efetuou-se uma revisão da literatura científica existente sobre extrações proteicas em insetos e optou-se pelo método utilizado por Yi *et al* [37], pois este permitiu extrair praticamente na sua totalidade a fração proteica solúvel da espécie *Tenebrio molitor*.

Inicialmente misturou-se, com o auxílio de uma varinha mágica e liquidificador, cerca de 50 g (P1) de amostra de grilo moído com 450 mL de uma solução tampão de 10 mM de fosfato de sódio e 0,1 M de cloreto de sódio a pH 10. A mistura foi mantida em agitação durante 16 h a 4°C e durante 1 h à temperatura ambiente, sendo depois filtrada com um peneiro de inox com uma malha de porosidade de 355 µm (VWR International, Vila Nova de Gaia, Portugal).

O resíduo (amostra não filtrada) foi recolhido e seco. O filtrado foi centrifugado (Sorvall LYNX 6000 Superspeed Centrifuge; ThermoFisher Scientific; Waltham, MA;

E.U.A) a 15000 × g durante 30 min a 4°C. A camada lipídica foi rejeitada e o sobrenadante e *pellet* foram recolhidos, congelados e posteriormente liofilizados, sendo o peso total de cada fração registado (P2). O teor proteico das 3 frações (resíduo não filtrado, pellet e sobrenadante) foi analisado segundo o método de Kjeldahl.

Além do cálculo do teor proteico de cada fração, foi também calculado a percentagem de proteína total da amostra presente em cada uma das frações:

$$\%PB \text{ total (presente na fração)} = \frac{\%PB \text{ fração} \times P2}{\%PB \times P1}$$

onde,

P1 – Peso da amostra a analisar;

P2 – Peso total da fração a analisar;

%PB – Teor em PB (%MS) da espécie a analisar;

%PB fração – Teor em PB (%MS) da fração a analisar.

6.5. Análise estatística

Para efetuar a análise estatística dos resultados utilizou-se o *software* GraphPad Prism 7.03 (GraphPad Software, Inc; La Jolla, CA, E.U.A). Para comparação dos resultados da composição química e minerais aplicou-se um *t* teste para detetar diferenças entre as duas espécies. Para análise dos resultados das extrações lipídicas foi aplicado um One-Way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. Foi usado um nível de significância de 0,05 em todos os estudos.

6.6. Análise sensorial de barras proteicas com incorporação de insetos inteiros e extratos desengordurados

De forma a avaliar-se o impacto sensorial da desengorduração dos insetos optou-se por fazer a sua incorporação num produto alimentar, que neste caso foram barras à base de cereais e frutos secos. A escolha deste produto baseou-se em dois fatores: existência no mercado de produtos similares (de modo a elaborar-se um produto cuja incorporação de insetos fosse apropriada) e facilidade de elaboração.

6.6.1 Elaboração das barras

A formulação das barras foi baseada em produtos análogos desenvolvidos num projeto anterior realizado no âmbito da Licenciatura em Ciências de Engenharia

Alimentar [192], com alterações a serem efetuadas de modo a otimizar o nível de incorporação de insetos, textura e sabor do produto.

Foi decidido elaborar-se cinco formulações diferentes (tabela 9) tendo como diferenças o modo de incorporação dos insetos.

Tabela 9. Formulações usadas para elaboração das barras. AD-W: *A. domesticus* inteiro; AD-E: *A. domesticus* desengordurado; GS-W: *G. sigillatus* inteiro; GS-E: *G. sigillatus* desengordurado

Formulação	Tâmaras (g)	Sultanas pretas (g)	Mel (g)	Manteiga de amendoim (g)	Azeite (g)	Flocos de aveia (g)	Flocos de centeio (g)	Linhaça dourada (g)	Sementes de girassol (g)	Amêndoa laminada (g)	Castanha do Brasil (g)	Grilo inteiro (g)	Resíduo desengordurado (g)
Controlo	10%	10%	13%	20%	7%	17%	10%	3%	3%	3%	3%	---	---
AD-W	9%	9%	12%	18%	6%	15%	9%	3%	3%	3%	3%	8%	---
AD-E	9%	9%	13%	19%	6%	16%	9%	3%	3%	3%	3%	---	6%
GS-W	9%	9%	12%	18%	6%	15%	9%	3%	3%	3%	3%	8%	---
GS-E	9%	9%	13%	19%	6%	16%	9%	3%	3%	3%	3%	---	6%

A maioria das matérias-primas utilizadas foram compradas já na forma pretendida, mas outras ainda necessitaram de transformações: as tâmaras e as sultanas pretas foram trituradas em pasta com um picador, as castanhas do Brasil foram fatiadas e as espécies de grilo foram finamente moídas. Todos estes processos foram realizados com o auxílio de um robot de cozinha (Major Titanium; Kenwood).

A elaboração das barras consistiu inicialmente na pesagem e mistura das matérias-primas foi feita com base no estado físico dela: as tâmaras, sultanas pretas, mel, manteiga de amendoim e azeite foram pesados juntos devido a serem matérias viscosas/líquidas, tendo os restantes materiais (flocos de aveia, flocos de centeio, linhaça dourada, sementes de girassol, amêndoa laminada, castanha do Brasil e grilos inteiros moídos/resíduo desengordurado de grilos) uma textura mais sólida e sendo pesados juntos. Depois da pesagem, aqueceu-se os componentes líquidos/viscosos em lume baixo até a mistura ter um aspeto liquefeito, altura em que se envolviam os materiais sólidos lentamente de modo a que todos os componentes ficassem devidamente misturados. De seguida o produto obtido era amassado até ficar uniformizado e levado ao forno a 160°C durante 16 minutos. Depois de se deixar arrefecer, o produto foi cortado em pedaços com pesos compreendidos entre 10 e 15 g para posterior utilização na prova sensorial (Fig. 2).

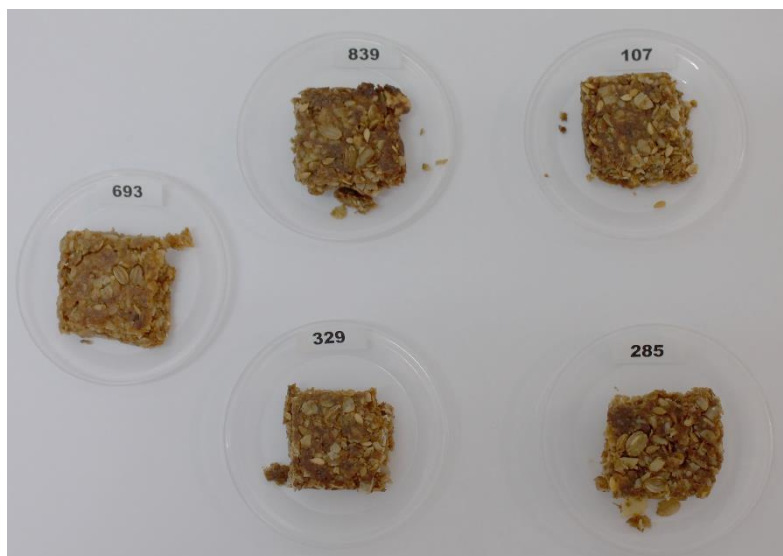


Fig. 2 - Exemplo das barras utilizadas na prova sensorial. 693 – Controlo; 839 – GS-W; 107 – GS-E; 329 – AD – W; 285 – AD - E

6.6.2. Prova sensorial

A prova sensorial foi realizada em parceria com a empresa Sense Test (Vila Nova de Gaia, Portugal), especializada na realização de provas sensoriais.

Os testes sensoriais foram realizados por provadores recrutados na base de dados da empresa Sense Test, entidade acreditada para a realização de ensaios sensoriais a produtos alimentares segundo a ISO 8589:2007, estando a proteção e confidencialidade dos dados assegurada pela autorização 2063/2009 da Comissão Nacional de Proteção de Dados. O recrutamento teve como base as respostas a inquérito sobre o consumo de insetos [193] aplicado previamente.

CHECK-ALL-THAT-APPLY (CATA)

A metodologia do Check-All-That-Apply (CATA) baseia-se em perguntas de escolha múltipla, cada uma com uma lista de palavras ou frases, da qual os provadores devem selecionar aquelas que consideram ser mais adequadas como resposta às perguntas colocadas. A principal vantagem deste tipo de perguntas é o facto de permitir aos provadores selecionarem mais do que uma opção, em vez de os limitar a escolher apenas uma resposta, ou força-los a focarem a sua atenção e avaliarem atributos demasiadamente específicos [194].

Adams *et al* [195] propôs a aplicação do CATA como um método simples que reúne informação acerca da perceção dos consumidores face às características sensoriais dos produtos alimentares. Como esta metodologia é principalmente utilizada

por consumidores, o número de provadores necessário para realizar uma caracterização sensorial, utilizando o CATA, pode variar entre 50 e 100 indivíduos [195, 196]. A lista de palavras ou frases nas questões CATA pode conter exclusivamente características sensoriais do produto, ou também incluir termos relacionados com características não sensoriais, como a ocasião de utilização, o posicionamento do produto e até emoções.

Embora o CATA seja uma ferramenta relativamente recente, dos métodos de avaliação sensorial de alimentos, parece ter-se tornado popular na otimização de produtos onde é usado para examinar a perceção do produto por parte dos consumidores. Nos últimos anos, vários estudos comprovaram a aplicação desta técnica numa vasta variedade de produtos, dos quais snacks salgados [195], morango [197], gelados [196], sobremesas lácteas [198], bebidas energéticas com sabor a laranja [199], refrigerantes com sabores a citrinos [200] e perceção de texturas de sobremesas lácteas [201]. Além destes, foi também utilizado como um processo adicional às classificações hedónicas, procurando fornecer uma alternativa aos mapas de preferência externos clássicos gerados a partir de perfis sensoriais [196]. Atendendo a alguns estudos que se dedicaram a comparar mapas sensoriais gerados por CATA e gerados por análise descritiva clássica (QDA®), conseguiu-se reportar resultados similares [196, 201].

Como foi referido anteriormente, cinco barras diferentes foram testadas (controlo sem incorporação de inseto, duas com incorporação de grilo inteiro moído e duas com incorporação de grilo desengordurado) sendo para cada barra utilizada uma ficha sensorial (anexo 1) avaliando a aceitação da amostra com uma escala hedónica de 9 valores (1- desgosto extremamente, 9 – gosto extremamente), a *Food Action Rating Scale* (FACT), traduzida de [202]: a vontade de comer a amostra caso estivesse disponível no mercado (1 – só se fosse forçado(a) é que comeria esta barra, 9 – comeria esta barra sempre que tivesse oportunidade) e características das amostras ordenadas por dimensão sensorial: aparência, odor, textura e sabor utilizando-se descritores associados tanto a barras com esta tipologia como também produtos com incorporação de insetos (teste do tipo CATA). Todos os participantes também realizaram outra ficha de avaliação (anexo 2) que procurou estabelecer quais as características (aparência, odor, textura e sabor) que um produto ideal desta tipologia deveria ter [203].

As provas sensoriais foram realizadas por 70 participantes (34% do sexo masculino e 66% do sexo feminino, apresentado uma média de idades de $32,7 \pm 9,5$

anos, distribuídos entre os 20 e 56 anos) previamente informados sobre o tipo de prova que iria ser realizada. Decorreram em cinco sessões durante um período de quatro dias nas instalações da Sense Test. Cada participante realizou a prova numa cabina individualizada (Fig. 3) tendo sido as barras apresentadas em regime de apresentação monádica sequencial, com balanceamento da ordem de apresentação das amostras entre os provadores, estando as amostras codificadas com códigos de três dígitos selecionados aleatoriamente.

Em cada cabine de provas, além das amostras, foi colocado à disposição dos provadores um tabuleiro que continha um guardanapo de papel, um copo com água e bolachas de água e sal, tendo-lhes sido informado que quer a água quer as bolachas deveriam ser usadas como limpadores do palato e que, sempre que necessário, poderiam cuspir as amostras para uma cuspidreira, utensílio também à sua disposição nas cabines.



Fig. 3 - Exemplo de cabine para realização de prova sensorial.

6.6.3 Análise estatística

Os resultados da prova sensorial foram analisados recorrendo ao software XL-STAT (Addinsoft, Paris, França) e às ferramentas de análise CATA (de modo a analisar os descritores das amostras e produto ideal) e teste de Wilcoxon para comparação dos níveis de aceitação e vontade de comer de cada amostra.

7. Resultados

7.1. Composição química e teores em minerais

A composição química das duas espécies de grilos estudadas é semelhante (tabela 10), apenas diferindo significativamente nos teores em MS (que são bastante perto de 100% devido às espécies utilizadas serem liofilizadas) e cinza que foram superiores em *A. domesticus*. Ambas as espécies contêm altos teores proteicos (ca. 65%, na MS) e lipídicos (ca. 24 %, na MS). Relativamente aos teores em fibra bruta e quitina não houve diferenças significativas entre as duas espécies.

Tabela 10. Composição em matéria seca (g/100 g \pm d.p), cinza, PB, GB, FB, ADF e quitina (g/100 g MS \pm d.p) das espécies de grilo *Acheta domesticus* e *Grylloides sigillatus*.

	<i>Acheta domesticus</i>	<i>Grylloides sigillatus</i>
Matéria seca	97,0 \pm 0,07 ^a	96,7 \pm 0,02 ^b
Cinza	4,9 \pm 0,00 ^a	4,2 \pm 0,02 ^b
PB	65,3 \pm 0,94	64,4 \pm 0,20
GB	23,7 \pm 0,11	23,5 \pm 0,07
FB	6,9 \pm 0,24	7,1 \pm 0,26
ADF	8,1 \pm 0,26	7,7 \pm 0,17
Quitina	5,1 \pm 0,00	4,6 \pm 0,35

Na mesma linha, letras diferentes indicam resultados significativamente diferentes.

Na tabela 11 são referidos os teores de minerais e metais quantificados nas duas espécies de grilos estudadas. Os restantes elementos analisados não foram detetados (Be, As, Y, Ag, Pb, Cd, U, Tl). É possível verificar que apesar de na maioria dos elementos as diferenças serem estatisticamente significativas, os valores entre as duas espécies acabam por ser muito semelhantes com exceção do Na e P, onde a espécie *A. domesticus* tem um teor muito mais alto que a espécie *G. sigillatus*.

Tabela 11. Teor em minerais e metais (mg/100 g MS \pm d.p) presente nas espécies de grilo *Acheta domesticus* e *Grylodes sigillatus*.

	<i>Acheta domesticus</i>	<i>Grylodes sigillatus</i>
K	987,0 \pm 12,77 ^a	870,9 \pm 18,55 ^b
Na	504,6 \pm 4,24 ^a	298,1 \pm 18,45 ^b
P	1806 \pm 275 ^a	782,1 \pm 86,71 ^b
Ca	103,6 \pm 10,11	117,3 \pm 12,17
Fe	7,7 \pm 0,16 ^a	4,7 \pm 0,31 ^b
Cu	5,1 \pm 0,00 ^a	4,6 \pm 0,35 ^b
Mg	43,8 \pm 2,37	42,7 \pm 1,84
Zn	24,4 \pm 0,25 ^a	16,8 \pm 0,31 ^b
Mn	3,7 \pm 0,23 ^a	2,9 \pm 0,44 ^b
Se	0,08 \pm 0,017	0,09 \pm 0,024
Li	0,007 \pm 0,0006 ^a	0,003 \pm 0,0005 ^b
V	0,009 \pm 0,001 ^a	0,002 \pm 0,0010 ^b
Cr	0,05 \pm 0,006	0,06 \pm 0,009
Co	0,07 \pm 0,006 ^a	0,004 \pm 0,0006 ^b
Ni	0,07 \pm 0,051	0,07 \pm 0,049
Rb	0,83 \pm 0,037 ^a	0,38 \pm 0,018 ^b
Sr	0,34 \pm 0,019	0,38 \pm 0,018
Mo	0,05 \pm 0,003 ^a	0,06 \pm 0,003 ^b
Ba	0,05 \pm 0,007	0,04 \pm 0,007
Ce	0,008 \pm 0,002	0,008 \pm 0,002

Na mesma linha, letras diferentes indicam resultados significativamente diferentes.

7.2. Extração lipídica

O etanol foi o solvente que permitiu uma melhor extração lipídica em ambas as espécies (*A. domesticus* – 28.2 \pm 1.6%, na MS; *G. sigillatus* – 28.4 \pm 1.1%, na MS) (Figs. 4A e 4B), sendo a diferença estatisticamente significativa comparativamente com as extrações realizadas com os outros solventes ($P \leq 0.0001$). Além desta diferença estatisticamente significativa entre o etanol e todos os outros solventes, apenas se verificou diferenças estatisticamente significativas entre a acetona e éter de petróleo, hexano e dietil éter.

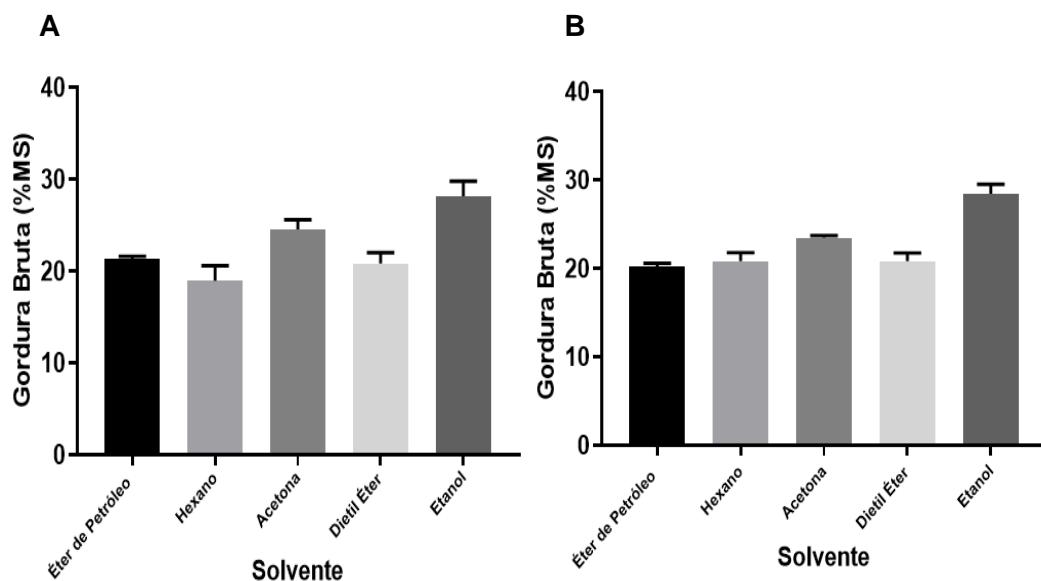


Fig. 4 – Teor em Gordura Bruta (% MS) resultante das extrações lipídicas realizadas com o método de Soxhlet para a espécie *A. domesticus* (A) e *G. sigillatus* (B).

A análise do teor lipídico dos resíduos desengordurados (Figs. 5A e 5B) revela que o resíduo desengordurado com etanol foi aquele que continha o menor teor de lípidos (1.4 ± 0.7 % (na MS) no resíduo desengordurado de *A. domesticus* e de 2.3 ± 0.7 % (na MS) no de *G. sigillatus*).

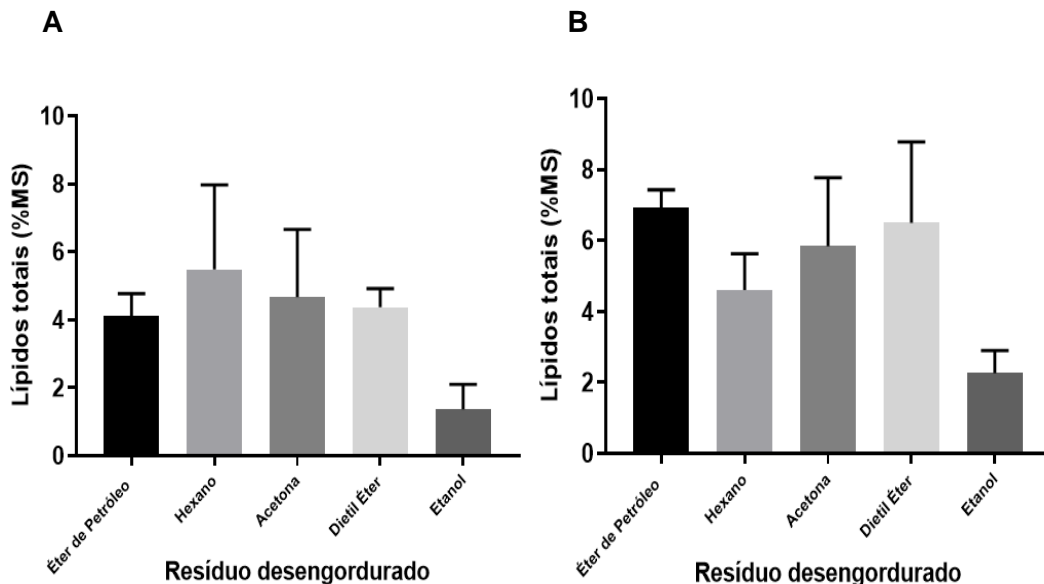


Fig. 5 – Teor em lípidos totais (% MS), resultantes das extrações lipídicas realizadas com o método de Folch, para os resíduos desengordurados com o método de Soxhlet para as espécies *A. domesticus* (A) e *G. sigillatus* (B).

Para calcular o rendimento das extrações lipídicas, fez-se a razão entre o teor lipídico dos resíduos desengordurados com o teor lipídico (calculado com o método de Folch) dos insetos inteiros ($20,4 \pm 1,41\%$ para *A. domesticus* e $18,9 \pm 1,66\%$ para *G. sigillatus*.) (tabela 12). Como expectável, as extrações realizadas com o etanol

permitiram uma maior extração da fração lipídica ($93,3 \pm 3,60\%$ para *A. domesticus* e $88,0 \pm 3,40\%$ para *G. sigillatus*).

Tabela 12. Rendimento das extrações lipídicas (% de fração lipídica extraída).

Solvente	<i>Acheta domesticus</i>	<i>Grylloides sigillatus</i>
Éter de Petróleo	$79,9 \pm 3,23$	$63,4 \pm 2,68^b$
Hexano	$73,1 \pm 12,12^b$	$75,6 \pm 5,43$
Acetona	$77,1 \pm 9,78$	$69,1 \pm 10,2$
Dietil Éter	$78,6 \pm 2,68$	$65,6 \pm 12,02^b$
Etanol	$93,3 \pm 3,60^a$	$88,0 \pm 3,40^a$

Letras diferentes na mesma coluna representam resultados estatisticamente diferentes.

7.3. Extração proteica

Ao analisar os resultados da extração proteica é possível verificar que não foi realizável a obtenção de um extrato proteico, em qualquer uma das espécies, tendo a maioria da proteína da amostra ficado retida no resíduo não filtrado (Fig. 6). O método escolhido [37] teoricamente permitiria aumentar a solubilidade da fração proteica dos insetos (através de alterações ao nível do pH e concentração salina), e assim obter um extrato rico em proteínas após filtração e centrifugação. No entanto, o sobrenadante foi a fração com menor teor em proteína (Fig. 7, *A. domesticus* - $39,3 \pm 0,1 \%$ e *G. sigillatus* - $32,6 \pm 0,2\%$).

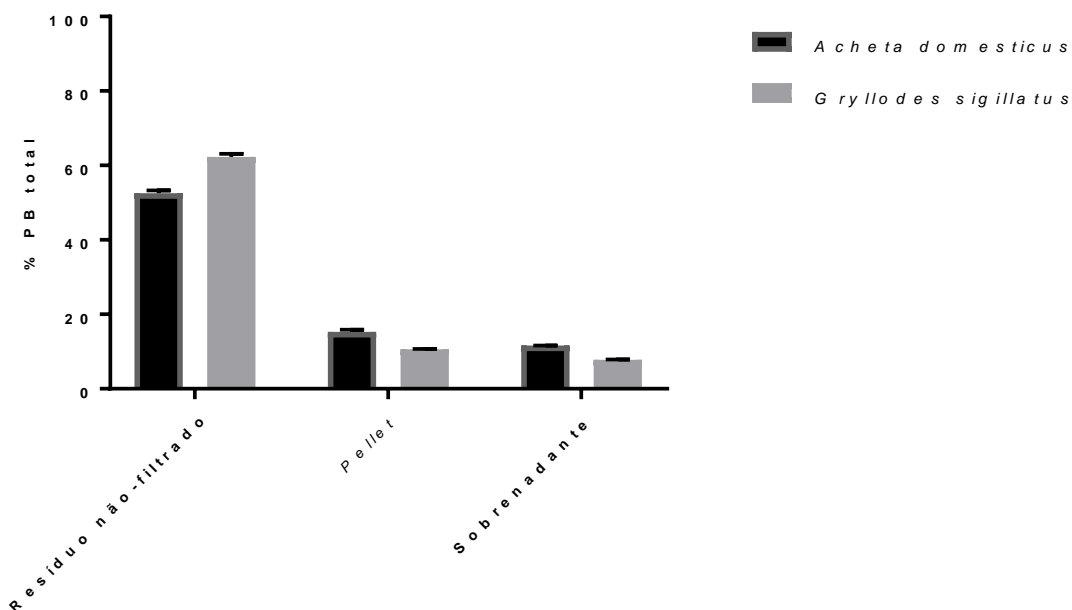


Fig. 6 - Proporção de PB total da amostra presente em cada uma das frações obtidas durante o processo de extração lipídica.

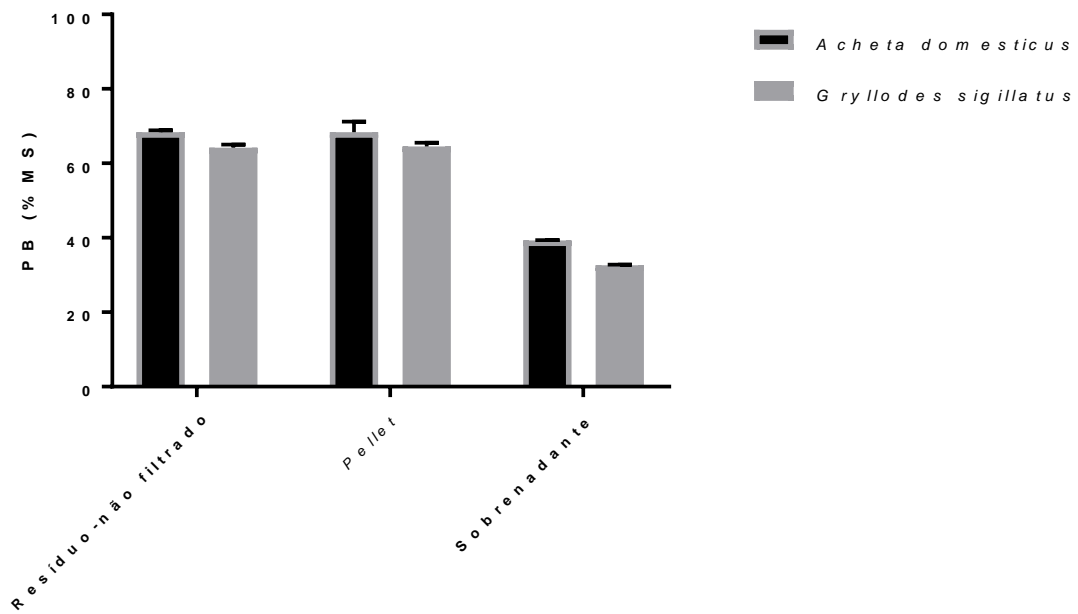


Fig. 7 - Teor em PB (%MS) de cada uma das frações obtidas durante o processo de extração proteica.

7.4. Provas sensoriais

Em termos de aceitação global e intenção de comer é possível ver que as amostras podem ser divididas em três grupos (Fig. 8): barras incorporando a espécie *G. sigillatus* inteira a têm as piores avaliações (aceitação – $4,1 \pm 0,25$; intenção de comer – $3,3 \pm 0,23$); seguido da barra com incorporação de *A. domesticus* inteiro (aceitação – $5,9 \pm 0,21$; intenção de comer – $5,0 \pm 0,22$); e finalmente as barras com os resíduos desengordurados (*G. sigillatus* aceitação – $7,0 \pm 0,15$; intenção de comer – $6,2 \pm 0,20$; *A. domesticus* aceitação – $7,0 \pm 0,15$; intenção de comer – $6,3 \pm 0,19$) e controlo (aceitação – $7,0 \pm 0,18$; intenção de comer – $6,5 \pm 0,21$) a terem avaliações positivas muito idênticas.

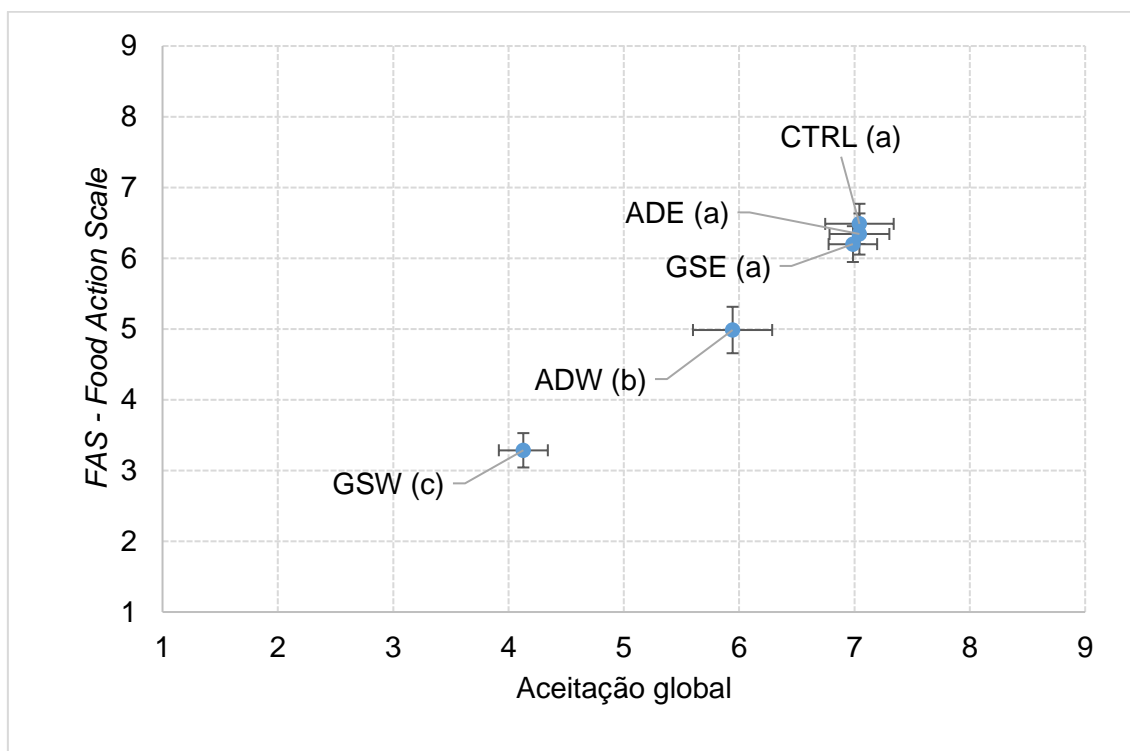


Fig. 8 - Representação gráfica das avaliações de aceitação global e intenção de comer (*Food Action Scale*) dos diferentes produtos testados. AD-W: *A. domesticus* inteiro; AD-E: *A. domesticus* desengordurado; GS-W: *G. sigillatus* inteiro; GS-E: *G. sigillatus* desengordurado; CTRL: Controlo. a,b,c - grupos homogêneos, de acordo com o teste de Wilcoxon (95 % confiança) aplicado a ambas as variáveis.

Ao analisar os resultados do teste de CATA (Figs. 9 e 10) é também possível ver que as barras podem ser divididas em três grupos com a barra cujas características mais se aproximaram do produto ideal foi a controlo (odor a mel e amendoim, sabor agradável, doce, a mel e amendoim, com cor dourada e textura húmida). As barras com incorporação de insetos desengordurados também se aproximaram do produto ideal (tendo, no entanto, uma cor acastanhada e textura seca que as diferenciam do produto ideal), enquanto as barras com incorporação de grilo inteiro ficaram afastadas destes

produtos, com várias descrições negativas a serem associadas a eles. A barra com incorporação de *A. domesticus* foi associada a um sabor na boca prolongado enquanto a barra com incorporação de *G. sigillatus* foi aquela que teve mais descritores negativos, nomeadamente ao nível do sabor (fim de boca muito desagradável, térreo e sabão) e odor (ranço, muito desagradável, desagradável, armário antigo ou mofo).

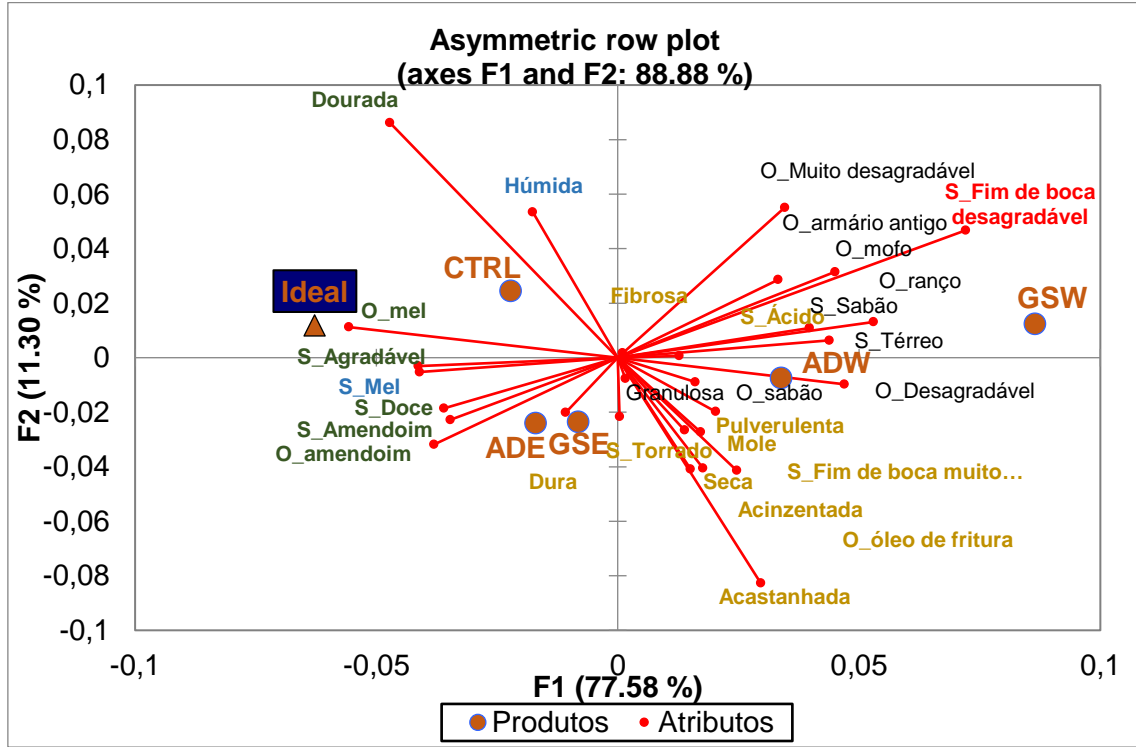


Fig. 9 - Análise de correspondência de frequência CATA para percepções sensoriais. AD-W: *A. domesticus* inteiro; AD-E: *A. domesticus* desengordurado; GS-W: *G. sigillatus* inteiro; GS-E: *G. sigillatus* desengordurado. Atributos a verde são considerados essenciais para o produto, a amarelo provocam efeito negativo, mas que não prejudicam o produto, a azul não têm influência e vermelho prejudicam negativamente a avaliação do produto.

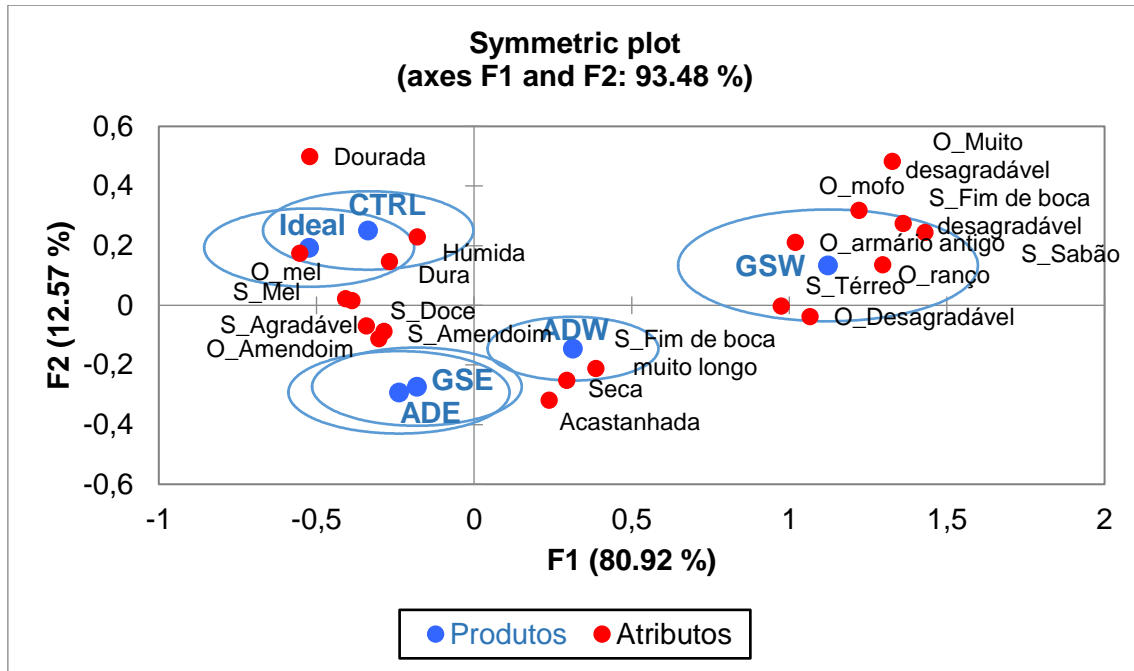


Fig. 10 - Análise de correspondência de frequência CATA baseado na tabela de contingências, contendo apenas atributos que influenciam significativamente os produtos, com sobreposição de elipses de confiança a 95% para os produtos. AD-W: *A. domesticus* inteiro; AD-E: *A. domesticus* desengordurado; GS-W: *G. sigillatus* inteiro; GS-E: *G. sigillatus* desengordurado.

8. Discussão

As espécies de grilo *A. domesticus* e *G. sigillatus* analisadas neste trabalho tiveram valores praticamente idênticos na sua composição nutricional, e revelaram-se fontes nutricionais com teores proteicos elevados (ca. 65%, na MS) tendo também um teor lipídico considerável (ca. 24 %, na MS) (tabela 10). Além disso, o consumo de 100 g de matéria seca destas duas espécies é suficiente para cumprir as doses diárias recomendadas [67, 68] de P, Fe, Zn e Cu (tabela 11). A análise dos minerais e metais também permitiu aferir a segurança alimentar destas espécies, não sendo detetados elementos potencialmente perigosos como As, Pb ou Cd, o que pode indicar que os substratos utilizados como rações não continham estes elementos [43]. Apesar de ser expectável que estas duas espécies tivessem valores nutricionais moderadamente semelhantes (tabela 1), o facto de tanto para os macronutrientes (tabela 10) e minerais (tabela 11) as diferenças entre as espécies ser praticamente inexistente, pode servir como indicador da grande influência que as dietas dos insetos tem nos seus valores nutricionais [21], pois estas duas espécies são provenientes do mesmo fornecedor sendo as suas dietas idênticas.

O teor em quitina estimado para as duas espécies foi ligeiramente inferior do que o teor em quitina determinado por Finke [50] (6.76% na MS), algo que é expectável pois

a determinação do teor em PB ligada ao ADF (em vez do teor em aminoácidos) irá sempre levar a uma subestimativa dos níveis de quitina.

A análise aos resultados das extrações lipídicas (Figs. 4 e 5 e tabela 12), permitiu escolher o etanol como o solvente que garante as melhores extrações lipídicas, pois no método de Soxhlet (Fig. 4) a utilização de etanol como solvente permitiu as maiores extrações da fração lipídica, resultados que foram confirmados pela análise dos resíduos desengordurados com método de Folch (Fig. 5 e tabela 12). No entanto é de salientar que a quantidade de lípidos extraídos com este solvente (Fig. 4) foi superior ao teor de GB calculado para ambas as espécies (tabela 10), o que indica que a extração com etanol extraiu outros elementos para além da fração lipídica. Esta escolha do etanol como solvente para desengorduração de insetos foi já utilizada noutros artigos [39] que estudaram a utilização de insetos na indústria alimentar.

Além da obtenção do extrato desengordurado, também se efetuou uma extração proteica com o objetivo de obter um extrato proteico passível de incorporação em produtos alimentares. O método escolhido [37] baseava-se numa extração aquosa com condições de pH e de sal que aumentassem a solubilidade da fração proteica, permitindo assim obter um sobrenadante após centrifugação que contivesse a totalidade da fração proteica do inseto. No entanto, a replicação desse método com as espécies em estudo foi um fracasso, com o sobrenadante a ter uma quantidade mínima da fração proteica total dos insetos (Fig. 6) e a ter um teor proteico bastante baixo (Fig. 7). A principal razão que pode ter influenciado estes resultados é que no método seguido [37] foi utilizada a espécie *T. molitor* não-liofilizada. Ou seja, além de haver uma diferença nas espécies utilizadas havia também uma diferença ao nível da quantidade de água nas amostras. Apesar de terem sido efetuadas alterações para corrigir esta diferença na quantidade de água dos insetos, elas não foram suficientes e porventura para espécies liofilizadas terão de ser considerados outras técnicas de extração.

Quanto à prova sensorial efetuada é claro que a desengorduração dos insetos teve um efeito positivo na avaliação sensorial feita às barras com incorporação de insetos. Tanto a aceitação global como a intenção de comprar (Fig. 8) das barras com incorporação de grilos desengordurados foram bastantes idênticas ao produto controlo, sendo estas marcadamente diferentes das barras com incorporação de grilos inteiros moídos que tiveram avaliações consideravelmente mais negativas (especialmente as barras com utilização de *G. sigillatus*). Esta diferença ao nível de aceitação e intenção de comer parece dever-se principalmente às diferentes características sensoriais (odor e sabor) que a desengorduração confere aos insetos (Figs. 9 e 10). Enquanto as barras

com incorporação de grilos inteiros moídos tiveram descrições negativas sobre o sabor (fim de boca desagradável, térreo, sabão) e odor (muito desagradável, mofo, ranço, armário antigo, desagradável), as barras com grilos desengordurados não foram associadas a esse tipo de descritores, estando muito mais próximas da barra controlo. É também significativo que as diferenças registadas entre as barras com *A. domesticus* inteiro e *G. sigillatus* inteiro (tanto nos níveis de aceitação e intenção de comer como no teste CATA) desapareceram por completo após a desengorduração. Estes resultados parecem indicar que a fração lipídica é responsável pelo sabor forte, desagradável e característico que é associado aos grilos. Esta hipótese tem fundamento teórico, visto que as espécies de grilo usualmente têm níveis elevados de ácidos gordos polinsaturados havendo assim possibilidade de sofrerem oxidação lipídica que confere sabores desagradáveis [62]. No entanto estes resultados parecem contradizer a assunção que as propriedades sensoriais dos insetos são afetadas pelas suas feromonas [59].

Estes resultados são bastante promissores para o desenvolvimento de produtos alimentares com a incorporação de grilos, pois o sabor desagradável destes produtos é um dos fatores responsáveis pela compra destes não se repetirem [127]. Ao utilizar uma fração de grilo que não confira o sabor desagradável será possível ultrapassar esta possível barreira sensorial, melhorando assim a qualidade geral destes produtos e passando uma imagem positiva sobre a entomofagia.

Mesmo assim, mais estudos são necessários sobre as propriedades sensoriais dos insetos, nomeadamente inferir quais os compostos da fração lipídica responsáveis pelos sabores desagradáveis detetados, se a desengorduração noutras espécies vai ter os mesmos efeitos nas propriedades sensoriais e qual a influência das dietas dos insetos nessas mesmas propriedades.

Parte C – Projeto desenvolvido em parceria com a FRULACT sobre o potencial da aplicação de insetos na indústria alimentar.

9. Material e métodos

9.1. Elaboração de preparados de fruta e cereais/frutos secos com incorporação de farinha de insetos

Os produtos elaborados foram preparados de fruta e cereais/frutos secos que possibilitassem o uso dos insetos como fonte proteica. O nível de incorporação dos insetos nestes preparados foi calculado de modo a que o preparado tivesse um teor proteico de 10%. Para a elaboração de provas sensoriais, os preparados elaborados foram incorporados a 20% numa base que consistia em logurte Mimosa Natural (suplementado com 6% de açúcar).

Para a elaboração dos preparados de fruta e cereais/frutos secos com incorporação de insetos decidiu estudar-se a inclusão de três espécies diferentes: grilos *Acheta domesticus* e *Gryllodes sigillatus* (mesma matéria-prima que foi utilizada na parte B) e larvas de besouro *Alphitobius diaperinus* (adquirida também à empresa Kreca/Proti-Farm). Os grilos foram finamente moídos utilizando um moinho de café (DeLonghi; Treviso, Itália) enquanto a *Alphitobius diaperinus* foi obtida já na forma de farinha. Saliente-se que nos produtos com incorporação de grilos optou-se por usar uma mistura 1:1 das duas espécies, pois não havia quantidade suficiente para fazer os produtos apenas com a incorporação de uma espécie.

Após a elaboração dos preparados foram monitorizados o pH (potenciómetro, Consort C860), grau Brix (refratómetro, Bellingham + Stanley Ltd.) e viscosidade (utilização de consistómetro). O controlo destes parâmetros foi feito em dois momentos distintos: imediatamente após a sua produção e 24 h após a produção, sendo procurado que os parâmetros cumprissem os limites impostos pela FRULACT (o que motivou várias alterações nas formulações dos preparados, ao nível do teor de açúcar, elementos espessantes e reguladores de acidez):

-Brix = 50 (± 2);

-pH \leq 4,5;

-Viscosidade > 4,5 (na medição feita 24 h após a produção).

9.2. Provas sensoriais

De forma a avaliar os produtos elaborados efetuaram-se duas provas sensoriais na FRULACT. As fichas de avaliação (anexo 3) utilizadas seguiram as metodologias usualmente adotadas em testes similares na FRULACT, procurando analisar-se as características gerais das amostras (cor, aroma, textura na boca, sabor, apreciação geral) recorrendo a uma escala hedónica com valores entre um (desgostei extremamente) e cinco (gostei extremamente). O nível de doçura das amostras foi analisado recorrendo a uma escala JAR (Just About Right) com pontuações a variar entre um (extremamente menos doce que o ideal) e cinco (extremamente mais doce que o ideal). Também foi avaliada a atitude de compra face ao consumo (*Food Action Rating Scale*), utilizando uma escala com cinco pontos (um – certamente não compraria; cinco – certamente compraria).

Após uma análise aos resultados da 1ª prova sensorial decidiu fazer-se uma nova prova utilizando fichas sensoriais idênticas, com produtos análogos (com a única diferença de não terem incorporação de insetos) aqueles que obtiveram os melhores resultados sensoriais na 1ª prova.

9.3. Análise Microbiológica

Tanto para as amostras de matéria-prima como para as amostras de preparados as análises microbiológicas efetuadas foram as mesmas. A quantificação de mesófilos totais (ISO 4833-1:2013) e fungos filamentosos e leveduras (ISO 21527:2008) fizeram-se de acordo com normas ISO, enquanto as quantificações de bactérias formadoras de esporos, mesófilos aeróbios, mesófilos anaeróbios, termófilos aeróbios e termófilos anaeróbios foram feitas de acordo com um método interno.

9.3.1. Matérias primas

As matérias primas analisadas foram a farinha de larva *Alphitobius diaperinus*, farinhas de grilo das espécies *Acheta domesticus* e *Gryllodes sigillatus* (analisadas individualmente), assim como uma mistura 1:1 das farinhas de grilo (de forma a mimetizar o modo de aplicação da farinha de grilo nos preparados). Os meios diluentes e meios de cultura utilizados foram preparados na FRULACT, segundo as instruções do fornecedor.

9.3.1.1. Quantificação de mesófilos totais e fungos filamentosos

Trabalhando à chama do bico de *Bunsen* (para se obter um ambiente estéril) transferiu-se 10 g da amostra a analisar para um frasco com 90 mL de meio suspensão *Buffered Peptone Water* (BPW) (Merck, Germany) (diluição 10^{-1}), homogeneizando o mesmo através de agitação manual. Após cerca de 30 minutos procedeu-se à realização das diluições sucessivas na câmara de fluxo laminar (Aura Mini, Bioair), começando por retirar 10 mL das suspensão-mãe (10^{-1}) para um frasco com 90 mL de meio BPW, fazendo-se a agitação manualmente. Repetiu-se este passo até se obterem as diluições pretendidas (que neste caso iam até 10^{-4}). Para a contagem de mesófilos totais utilizaram-se todas as diluições enquanto para a quantificação de fungos apenas foram utilizadas as diluições até 10^{-3} . Para a quantificação de mesófilos totais aplicou-se a técnica de incorporação. Para isso, colocou-se 1 mL de inóculo em placas de Petri, a partir das soluções preparadas, em quadruplicado, seguido da adição do meio PCA (aproximadamente 20 mL) (VWR Chemicals, Belgium). Por fim, as placas foram incubadas na estufa a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 72 ± 3 h.

Para a quantificação de fungos filamentosos e leveduras utilizou-se o meio DG-18 (Merck, Germany), pipetando-se 0,2 mL do inóculo, pela técnica por espalhamento. As placas foram depois incubadas numa estufa a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 5 dias.

9.3.1.2. Quantificação de bactérias formadoras de esporos

Inicialmente fez-se a primeira diluição (10^{-1}) pesando-se 50 g de matéria prima para um frasco com 450 mL de BPW homogeneizando-se manualmente. Transferiu-se 40 mL de cada uma das soluções para 2 tubos Falcon de 50 mL. Juntamente com um tubo controlo (tubo Falcon contendo 40 mL de água para controlo de temperatura) as amostras foram então sujeitas a um tratamento térmico, colocando-as num banho térmico a 80°C , durante 10 minutos. Após o final do tratamento térmico aplicou-se um choque térmico às amostras através de arrefecimento em água fria (cerca de 26°C). De seguida fez-se a segunda diluição (10^{-2}) transferindo-se 1 mL de cada um dos tubos Falcon para um tubo Falcon contendo 9 mL de BPW.

De seguida, aplicou-se a técnica por incorporação com PCA e colocou-se as placas a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 72 ± 3 h (para quantificação de mesófilos aeróbios) e a $55 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 48 ± 2 h (para quantificação de termófilos aeróbios), em quadruplicado para cada uma das diluições. Para análise de bactérias formadoras de esporos anaeróbios, aplicou-se a mesma técnica, mas utilizando o meio *Reinforced Clostridial Agar* (RCA) (Merck, Germany) sendo duas placas incubadas a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 72 ± 3 h (para

quantificação de mesófilos anaeróbios) e outras duas a $55 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 48 ± 3 h (para quantificação de termófilos anaeróbios). Para cada uma das incubações as placas foram colocadas em jarras de anaerobiose juntamente com geradores de anaerobiose (Anaerocult, Sigma-Aldrich) e o respetivo indicador.

9.3.2 Preparados

As análises microbiológicas feitas aos preparados produzidos na FRULACT (descritos anteriormente) seguiram os procedimentos apresentados para as análises microbiológicas feitas às matérias primas.

9.4 Análise estatística

Para efetuar a análise estatística dos resultados das provas sensoriais utilizou-se o *software* GraphPad Prism 7.03 (GraphPad Software, Inc; La Jolla, CA, E.U.A) sendo aplicado um One-Way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. Foi usado um nível de significância de 0,05 em todos os estudos. Também foi utilizado o *software* XLSTAT (Addinsoft, Paris, França), correndo o programa de Penalty Analysis para avaliar a doçura das amostras.

10. Resultados

10.1. Elaboração de produtos

Os preparados desenvolvidos na FRULACT (com informação relativa às matérias-primas e aromatizações utilizadas) assim como os valores dos seus parâmetros físico-químicos encontram-se listados nas tabelas 13 e 14, respetivamente.

Tabela 13. Lista dos preparados elaborados no projeto desenvolvido em parceria com a Frulact.

Código	Preparado	Aromatizações
A	Avelã	Avelã e Caramelo
B	Banana, bolacha micronizada e bolacha	1 - Banana, caramelo e biscoito 2 - Banana e baunilha
C	Cocô e sumo de lima	Cocô, limão e caramelo
D	Framboesa	1- Framboesa, morango e açúcar 2- Frutos silvestres
E	Café e Chocolate negro	Caramelo e cacau
F	Mel e noz	Mel e noz

Os preparados desenvolvidos no seguimento deste projeto tiveram como base formulações usadas pela FRULACT no âmbito de outros projetos, tendo sido escolhidos

preparados que utilizassem matérias-primas com sabores fortes e que pudessem combinar com a incorporação de insetos tanto a nível sensorial como a nível visual (por exemplo a utilização de pedaços de avelã ou noz nos preparados A e F respetivamente). Foi também tido em consideração os produtos existentes no mercado que incorporam insetos (nomeadamente barras energéticas) e os sabores utilizados, sendo escolhidos preparados com sabores idênticos a alguns desses produtos (como por exemplo o preparado C – Cocô e sumo de lima).

Para ambas as espécies as concentrações de matérias-primas e aromas foram iguais, havendo só diferenças ao nível de reguladores de acidez, água, açúcar ou amido de modo a controlar os parâmetros físico-químicos (tabela 14). No resto deste documento cada preparado é mencionado pelo código descrito na tabela 13, juntamente com a letra L (no caso de ter incorporação de farinha de larva de *A. diaperinus*) ou G (no caso de ter incorporação das farinhas das duas espécies de grilo *A. domesticus* e *G. sigillatus*). Nos casos necessários (para os preparados A e D) a especificação da aromatização usada é feita recorrendo ao número 1 ou 2, conforme descrito na tabela 13.

Como foi referido anteriormente, o produto final consistiu numa aplicação de 20% do preparado numa base, que neste caso foi logurte Mimosa Natural (suplementada com 6% de açúcar).

Tabela 14. Avaliação dos parâmetros físico-químicos dos preparados elaborados no projeto desenvolvido em parceria com a Frulact

Preparado		Brix		pH		Cenco	
		Produção	24H depois	Produção	24H depois	Produção	24H depois
A	G	51	49,5	4,24	4,5	11,5	1
	L	49,5	51,7	4,31	4,51	8	3
B	G	47,6	45,4	4,36	4,28	3,5	0
	L	47,3	48	4,5	4,46	9	5
C	G	53,1	49,6	4,45	4,33	10,5	3,5
	L	49,5	47,8	4,64	4,45	11	5,5
D	G	48,4	47,9	4,59	4,44	12	5,5
	L	48,5	51,7	4,46	4,45	9,5	6,5
E	G	49,5	49,1	4,37	4,41	6,5	0
	L	50,4	48	4,63	4,52	12	4,5
F	G	50,2	51,4	4,34	4,31	9,5	4
	L	50,2	49,8	4,24	4,22	12,5	6

10.2. Avaliação sensorial dos produtos com incorporação de insetos

Os produtos elaborados foram testados por um número díspar de provadores entre si, havendo vários produtos que tiveram um número bastante reduzido de provadores (tabela 15).

Tabela 15. Informação relativa ao número de provadores de cada produto.

Preparado		Número de provadores
A	G	12
	L	20
B	1-G	14
	1-L	22
	2-G	7
	2-L	7
C	G	9
	L	18
D	1-G	9
	1-L	18
	2-G	14
	2-L	14
E	G	7
	L	7
F	G	12
	L	12

10.2.1 Aparência

Ao nível da aparência não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes produtos, tendo os produtos uma avaliação globalmente positiva (entre $2,7 \pm 0,8$ e $3,9 \pm 0,9$).

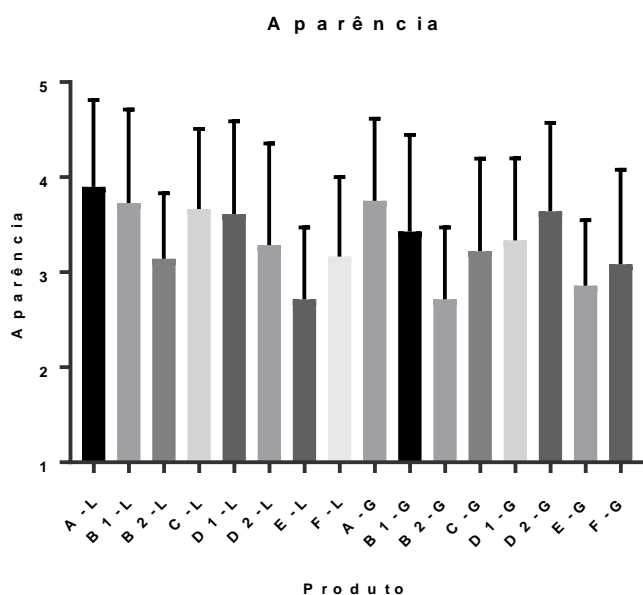


Fig. 11 – Avaliação da aparência dos produtos com incorporação de inseto.

10.2.2 Aroma

Ao nível do aroma já se registaram diferenças significativas entre os produtos com incorporação de farinha de *A. diaperinus* e incorporação de farinha de grilo, com os primeiros a terem uma avaliação mais positiva. Os produtos com avaliação mais positiva foram o A-L (Avelã-Caramelo com incorporação de farinha de *A. diaperinus* – $4,0 \pm 0,8$), e C-L (Cocô-Lima e Caramelo com incorporação de farinha de *A. diaperinus* – $3,9 \pm 0,7$).

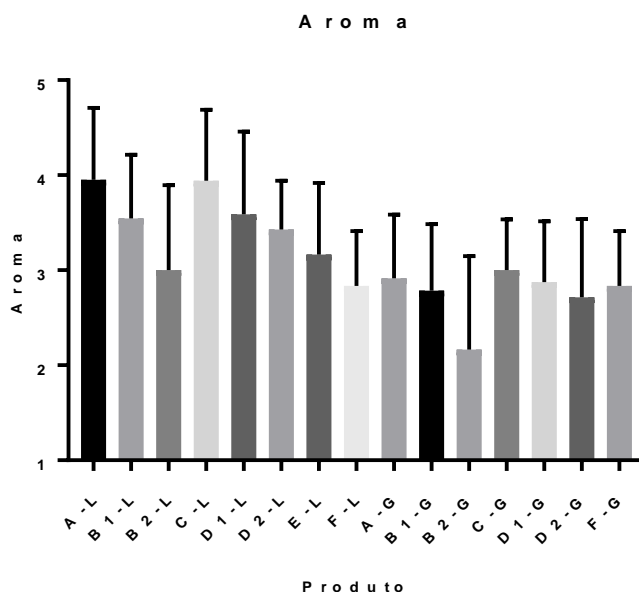


Fig. 12 - Avaliação do aroma dos produtos com incorporação de inseto.

10.2.3 Sabor

Ao nível do sabor é evidente que os produtos com incorporação de farinha de *A. diaperinus* tiveram avaliações muito mais positivas (praticamente sempre com diferenças estatisticamente significativas) em comparação com os produtos com incorporação de farinha de grilo (com exceção do preparado F-L). Os preparados com incorporação de grilo tiveram avaliações bastante negativas, com a avaliação mais positiva a ser do preparado F-G (Mel-Noz, $2,4 \pm 0,9$). Os preparados com avaliação mais positiva foram o A-L (Avelã-Caramelo, $4,0 \pm 1,0$) e D2-L (Framboesa-Frutos Silvestres, $3,7 \pm 0,6$), e entre os preparados com incorporação de farinha de *A. diaperinus* apenas tiveram diferenças significativa para o preparado F-L (Mel-Noz).

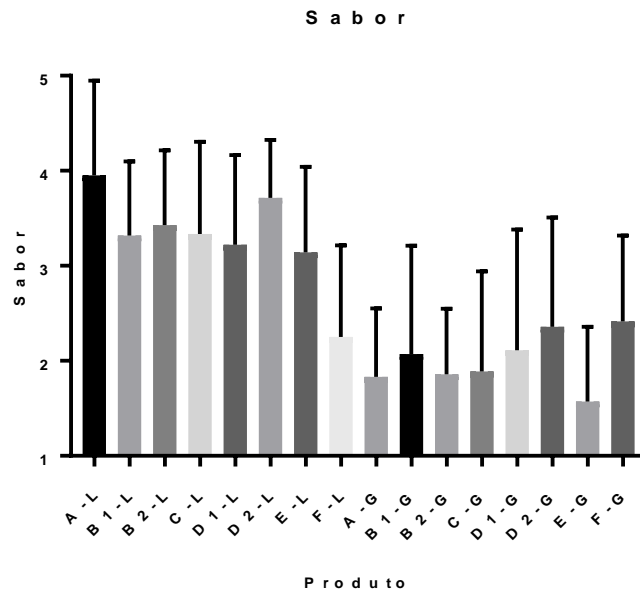


Fig. 13 - Avaliação do sabor dos produtos com incorporação de inseto.

10.2.4 Textura

A textura foi a característica com piores avaliações gerais. Não se registaram diferenças significativas entre os diferentes produtos, sendo as avaliações geralmente negativas com a mais positiva a ser de apenas $3,1 \pm 1,1$ (A-L).

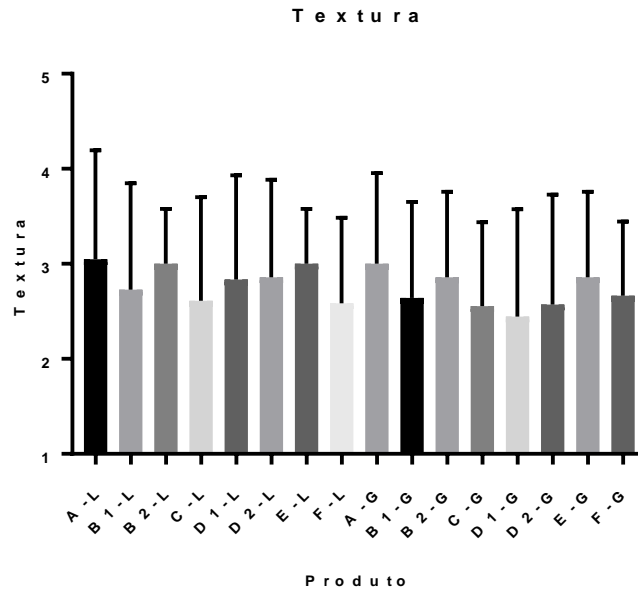


Fig. 14 - Avaliação da textura dos produtos com incorporação de inseto.

10.2.5. Apreciação global

A apreciação global dos produtos seguiu uma tendência semelhante à verificada para a avaliação do sabor, com os produtos com incorporação de *A. diaperinus* a terem avaliações mais positivas que os produtos com incorporação de farinha de grilos (com exceção do preparado F-L). O produto com a avaliação mais positiva foi o A-L (Avelã-Caramelo, $3,8 \pm 0,8$), que foi o único que teve diferenças estatisticamente significativas para todos os produtos com incorporação de farinhas de grilo e também F-L (Mel-Noz com incorporação de farinha de *A. diaperinus*).

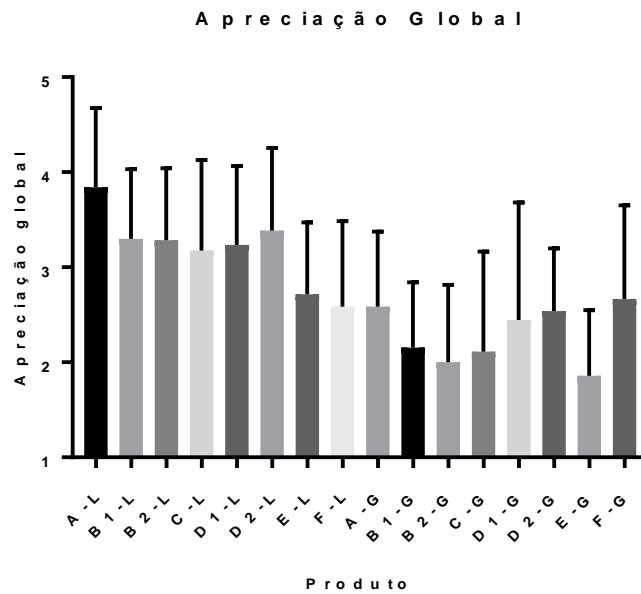


Fig. 15 - Avaliação da apreciação global dos produtos com incorporação de inseto.

10.2.6. Atitude de compra

Quanto à atitude de compra, todos os produtos com incorporação de farinha de *A. diaperinus* tiveram avaliações mais positivas que os produtos com incorporação de farinha de grilo (cujas avaliações mais positivas foram de apenas $1,9 \pm 1,1$, ao preparado D2-G). No entanto, apenas o preparado A-L ($3,8 \pm 1,2$) teve uma avaliação com diferenças significativas para os produtos com incorporação de farinha de grilo.

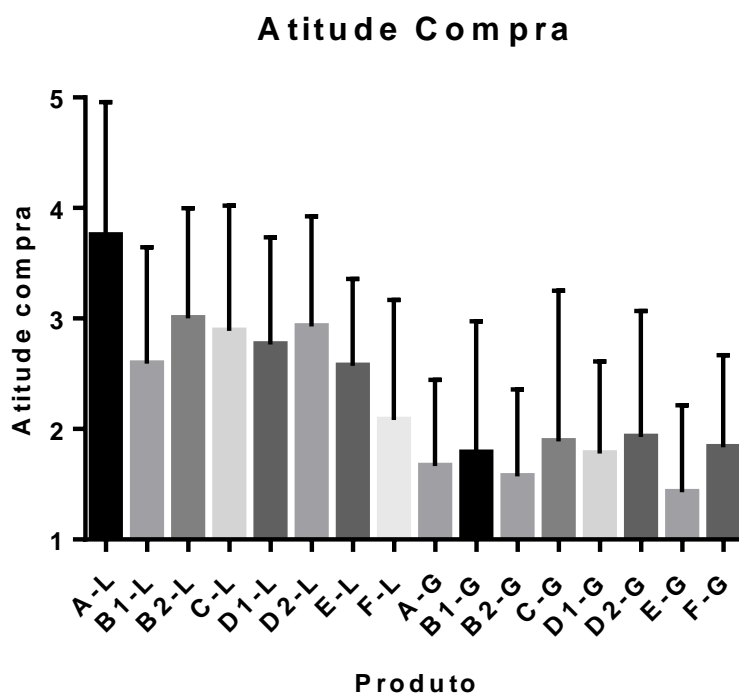


Fig. 16 - Avaliação da atitude de compra dos produtos com incorporação de inseto

10.2.7. Doçura

A análise à doçura foi apenas efetuada para os 4 produtos que apresentaram avaliações sensoriais mais positivas (A-L, B1-L, C-L e D1-L), pois este tipo de análise requer um número mínimo de cerca de 20 provadores (algo que não se verificou para a esmagadora maioria dos produtos – tabela 15) e estes são os produtos onde a caracterização completa é mais útil para a FRULACT.

Nos quatro produtos analisados, nenhum apresentou resultados estatisticamente significativos, sugerindo que a doçura dos produtos não teve grande influência na avaliação dos mesmos.

10.3. Comparação sensorial entre produtos com incorporação de insetos e produtos análogos sem incorporação de insetos

Após análise dos resultados da prova sensorial realizada com os produtos com incorporação de insetos, escolheu-se os quatro preparados que tiveram avaliações gerais mais positivas (tabela 16) e fez-se nova prova com produtos análogos (cada um com 17 provadores) sem incorporação de inseto de forma a poder comparar o efeito sensorial dos insetos nos produtos.

Tabela 16. Avaliações sensoriais dos produtos com incorporação de insetos que tiveram resultados mais positivos

Preparado	Aparência	Cheiro	Sabor	Textura	Ap. Global	Atitude Compra
A-L	3,9 ± 0,9	4,0 ± 0,8	4,0 ± 1,0	3,1 ± 1,2	3,8 ± 0,8	3,8 ± 1,2
B1-L	3,7 ± 1,0	3,6 ± 0,7	3,3 ± 0,8	2,7 ± 1,1	3,3 ± 0,7	2,6 ± 1,1
C-L	3,7 ± 0,8	3,8 ± 0,8	3,3 ± 1,0	2,6 ± 1,1	3,2 ± 1,0	2,9 ± 1,1
D1-L	3,6 ± 1,0	3,6 ± 0,9	3,2 ± 1,0	2,8 ± 1,1	3,2 ± 0,8	2,8 ± 0,9

Para todos os produtos testados a única característica cuja avaliação teve uma diferença significativa foi a textura, com os produtos sem inseto a terem avaliações mais positivas que os produtos análogos com incorporação de inseto. Em todas as outras características (incluindo sabor e atitude de compra) os valores foram bastantes semelhantes para os produtos testados.

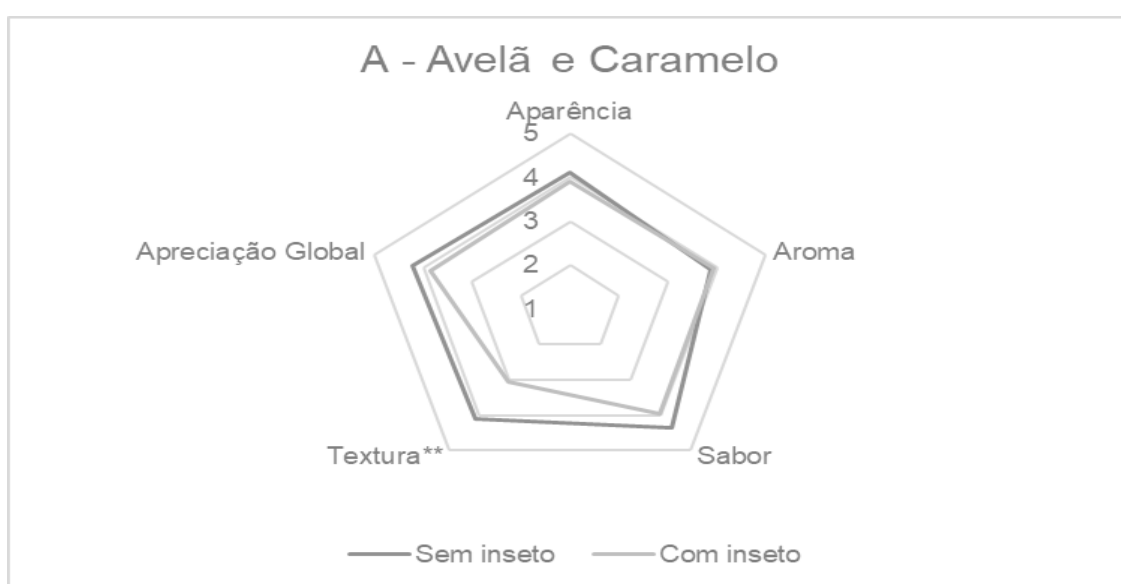


Fig. 17 - Comparação sensorial entre preparado A-L e produto análogo sem incorporação de inseto. **Diferença estatisticamente significativa ($P = 0,0052$).

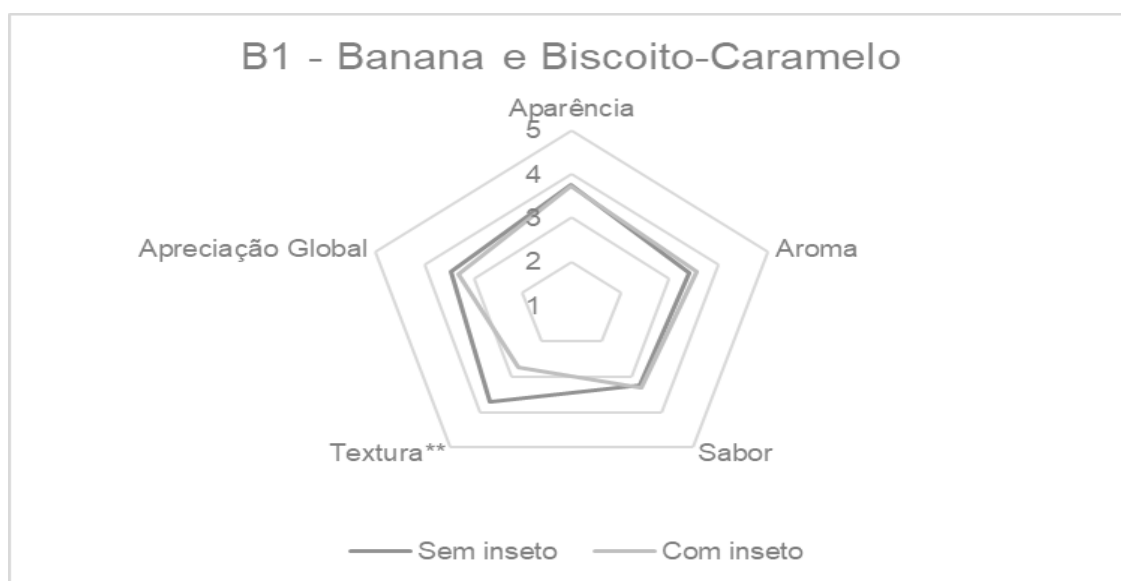


Fig.18 – Comparação sensorial entre preparado B1-L e produto análogo sem incorporação de inseto. **Diferença estatisticamente significativa ($P = 0,0050$).

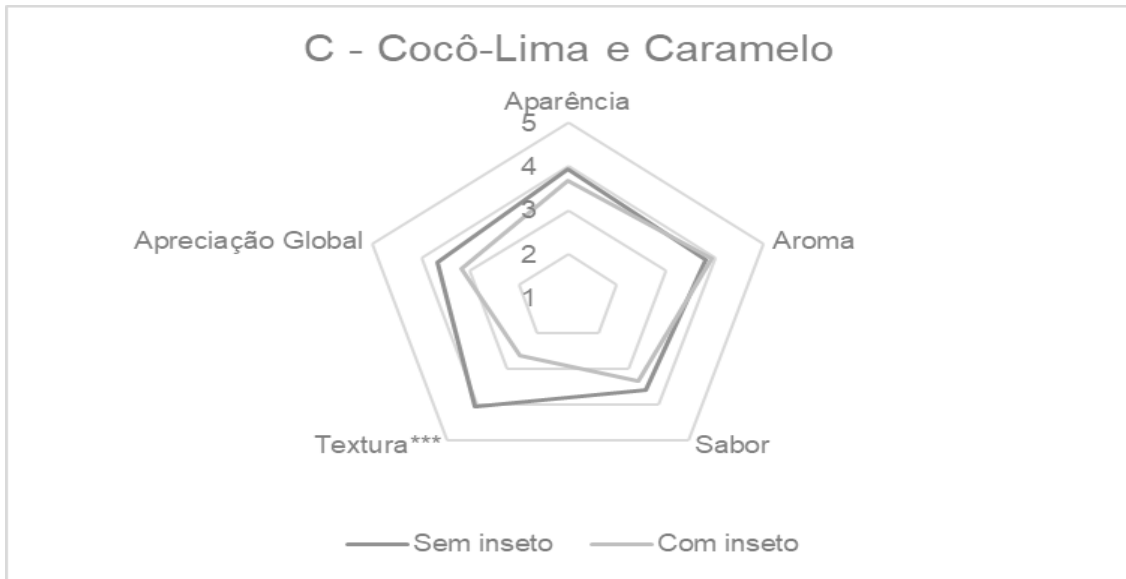


Fig.19 – Comparação sensorial entre preparado C-L e produto análogo sem incorporação de inseto. ***Diferença estatisticamente significativa ($P < 0,0001$).



Fig. 20 - Comparação sensorial entre preparado D1-L e produto análogo sem incorporação de inseto. **Diferença estatisticamente significativa ($P = 0,0022$).

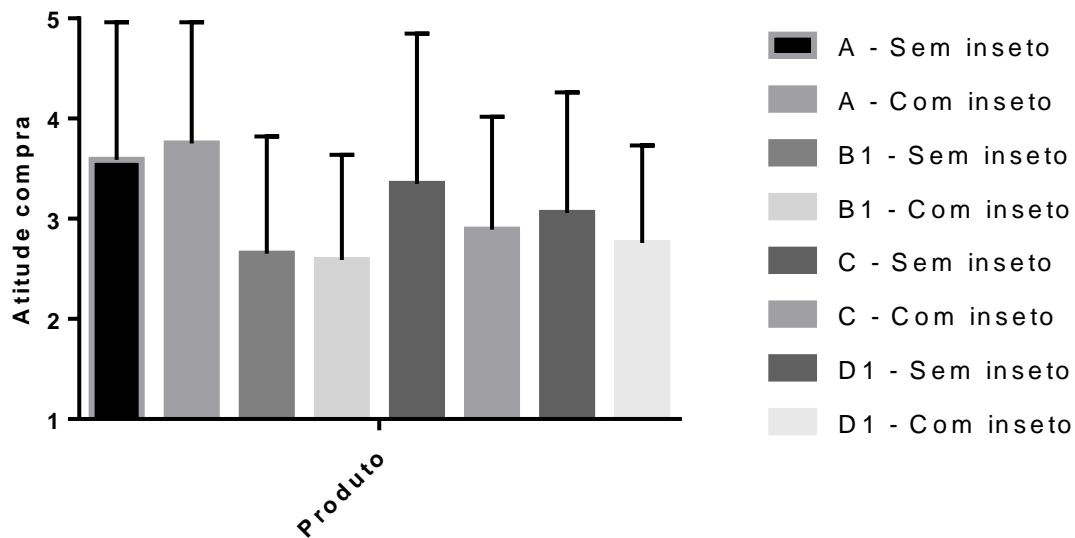


Fig. 21 - Comparação da atitude de compra entre produtos análogos com e sem inseto.

10.4. Análise microbiológica

10.4.1 Matérias-primas

As figuras 22 e 23 representam graficamente a carga microbiológica das diferentes espécies de insetos utilizadas durante este projeto na elaboração de produtos. É importante salientar que não foi possível obter resultados da carga microbiológica de mesófilos totais e bactérias formadoras de esporos aeróbias mesófilas e termófilas para a espécie *A. diaperinus* pois em todas as diluições utilizadas as placas estavam incontáveis.

A quantificação de mesófilos totais (Fig. 22) para as amostras de grilos, revelou que estas se encontram contaminadas: *Acheta domesticus* ($4,0 \pm 0,2$ lg(UFC/g)), *Grylloides sigillatus* ($3,2 \pm 0,2$ lg(UFC/g)) e mistura de farinhas de grilo AD/GS ($3,7 \pm 0,2$ lg(UFC/g)). Quantificações semelhantes verificaram-se para bactérias formadoras de esporos aeróbias termófilas. De relevo, na quantificação de bactérias formadoras de esporos aeróbias termófilas (Fig. 22) tanto para *Acheta domesticus*, como para *Grylloides sigillatus*, não foi possível fazer qualquer quantificação, enquanto que na mistura das farinhas já foi possível fazer uma quantificação ($3,0 \pm 0,1$ lg(UFC/g)). Para a quantificação de bactérias formadoras de esporos anaeróbias termófilas (Fig. 22), não houve quantificação em nenhuma das farinhas de grilo analisadas, enquanto para *A. diaperinus* a quantificação ficou abaixo do limite de deteção. No entanto, para as

mesófilas (Fig. 22) já houve deteção para todas as amostras, com a espécie *A. diaperinus* a apresentar-se claramente mais contaminado ($4,0 \pm 0,0$ lg(UFC/g)).

Relativamente à análise de fungos filamentosos (Fig. 23), estes não foram quantificados na espécie *A. diaperinus* enquanto para as espécies de grilos nenhuma das quantificações encontrou-se acima do limite de deteção (2,0 lg (UFC/g)).

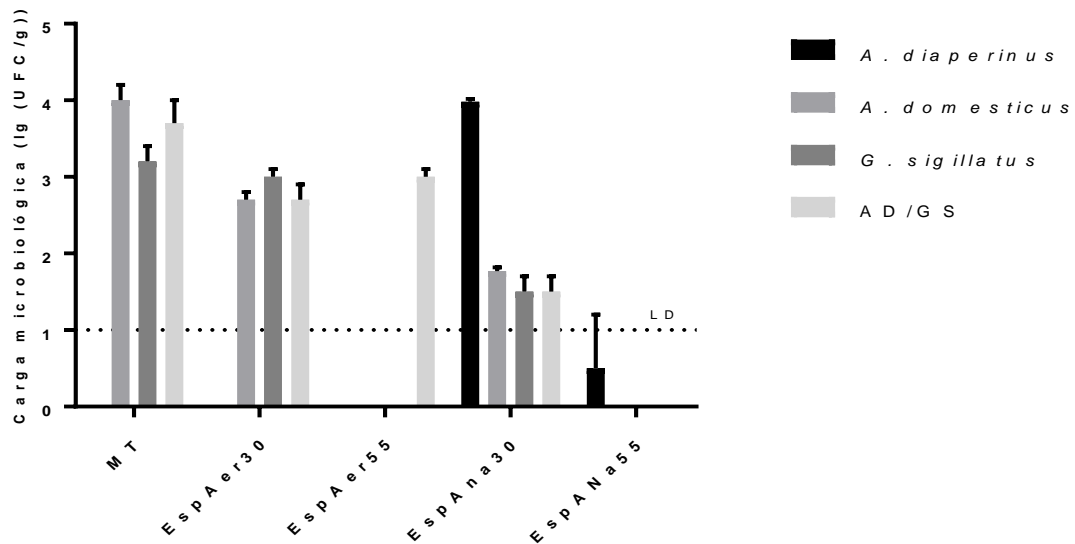


Fig. 22 - Carga microbiológica das matérias-primas (espécies de inseto). MT – Mesófilos totais; EspAer30 – Bactérias formadoras de esporos aeróbias mesófilas; EspAer55 - Bactérias formadoras de esporos aeróbias termófilas; EspAna30 - Bactérias formadoras de esporos anaeróbias mesófila; EspAna55 - Bactérias formadoras de esporos anaeróbias termófilas; LD – Limite de deteção 1 lg (UFC/g)

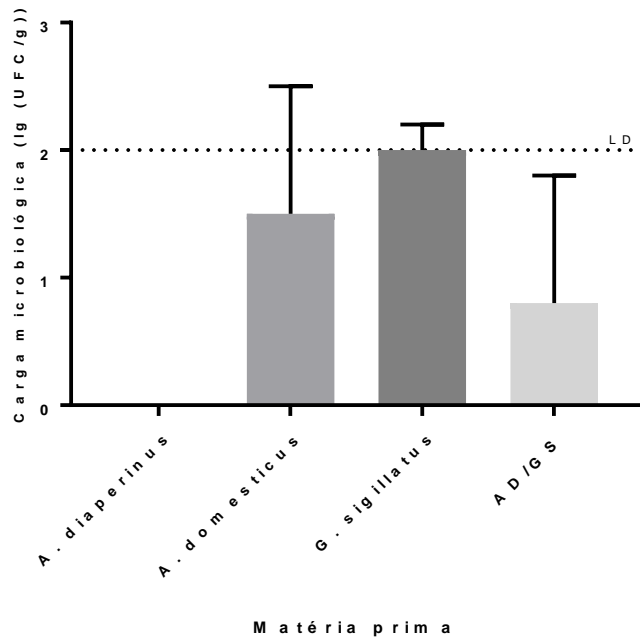


Fig. 23 - Carga microbiológica das diferentes matérias-primas em termos de fungos filamentosos. LD – limite de deteção 2 lg (UFC/g)

10.4.2 Preparados

Analisando o gráfico da figura 24, é possível ver que todos os preparados analisados se apresentavam contaminados ao nível de mesófilos totais, e que o preparado E-L (café-chocolate com incorporação de farinha de *A. diaperinus* - $4,4 \pm 0,2$ lg(UFC/g)) é aquele que tem uma maior quantificação de mesófilos totais.

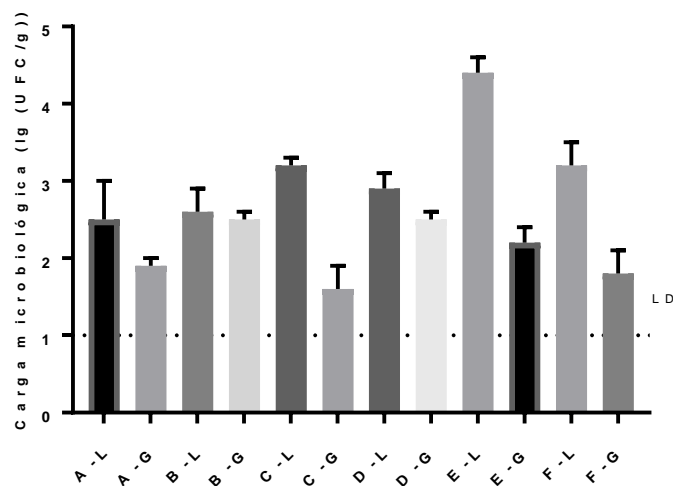


Fig. 24 - Carga microbiológica dos diferentes preparados elaborados em termos de mesófilos totais. LD – limite de deteção 1 lg (UFC/g)

Todos os produtos analisados estavam contaminados com bactérias formadoras de esporos aeróbias mesófilas (Fig. 25), apesar de a maioria dos produtos com incorporação de farinha de AD/GS apresentar níveis de contaminação bastante inferiores aos produtos com incorporação de farinha de *A. diaperinus*. De destacar quatro produtos (todos incorporando farinha de *A. diaperinus*) que se apresentam claramente contaminados quando comparados com os restantes: B-L (Banana-Bolacha-Caramelo - $3,6 \pm 0,1$ lg(UFC/g)), C-L (Cocô-Lima - $3,5 \pm 0,1$ lg(UFC/g)), E-L (Café-Chocolate - $3,7 \pm 0,6$ lg(UFC/g)) e F-L (Mel-Noz - $3,8 \pm 0,1$ lg(UFC/g)).

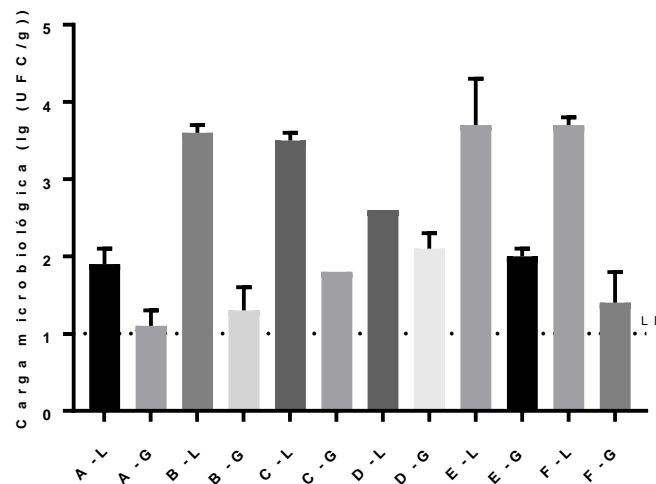


Fig. 25 - Carga microbiológica dos diferentes preparados elaborados em termos de bactérias formadoras de esporos aeróbias mesófilas. LD – limite de deteção 1 lg (UFC/g)

Relativamente aos níveis de bactérias formadoras de esporos aeróbias termófilas (Fig. 26), é notório que os produtos com incorporação de farinha de *A. diaperinus* estão mais contaminados que os produtos com incorporação de farinha de AD/GS (cuja maioria dos produtos ou não apresenta quaisquer bactérias ou a quantificação fica abaixo do limite de deteção).

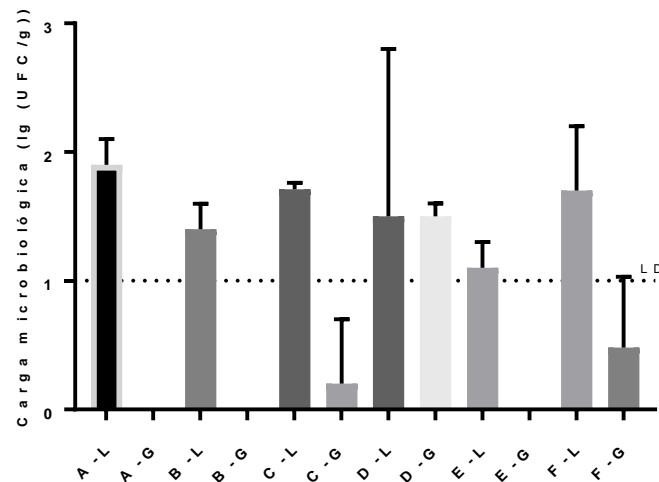


Fig. 26 - Carga microbiana dos diferentes preparados elaborados em termos de bactérias formadoras de esporos aeróbias termófilas. LD – limite de deteção 1 lg (UFC/g)

Para os 12 preparados analisados, apenas houve quantificação de fungos filamentosos em dois deles: A-L (Avelã com incorporação de *A. diaperinus* - $3,5 \pm 0,1$ lg(UFC/g)) e F-L (Mel-Noz com incorporação de *A. diaperinus* - $4,6 \pm 0,1$ lg(UFC/g)).

Relativamente à análise das bactérias formadoras de esporos anaeróbias mesófilas, com exceção do preparado D-G (Framboesa com incorporação de AD/GS – $1,5 \pm 0,1$ lg(UFC/g)) não foi possível quantificar este tipo de bactérias em nenhum dos preparados. Quanto às termófilas, não foi possível fazer a sua quantificação em nenhum dos preparados analisados

11. Discussão

Os produtos desenvolvidos no estágio realizado na Frulact consistiram em preparados de fruta e cereais/frutos secos com a incorporação de larva de *A. diaperinus* e mistura 1:1 das espécies de grilo *A. domesticus* e *G. sigillatus*. Sendo a área da entomofagia ainda uma inovação que só agora está a começar a ser explorada pela Frulact, o grande objetivo foi desenvolver produtos apropriados para a incorporação de insetos, identificado potenciais limitações de modo a poder começar-se a dar os primeiros passos para o desenvolvimento de produtos que num futuro próximo possam estar disponíveis nos mercados.

Assim, com as provas sensoriais que foram realizadas foi possível identificar algumas características dos produtos que podem guiar o futuro desenvolvimento de

produtos à base de insetos. Primeiro, no que diz respeito às espécies utilizadas foi evidente que os preparados com incorporação de grilos tiveram avaliações sensoriais muito mais negativas que aqueles com incorporação de *A. diaperinus* (nomeadamente ao nível do sabor e aceitação global), e nenhum dos preparados desenvolvidos conseguiu mascarar o sabor forte e desagradável que os grilos atribuíram aos produtos. Ora, sendo o sabor um dos principais fatores que motivam as escolhas alimentares [138], uma possível comercialização de produtos à base de grilos pode estar comprometida. Nesta perspetiva, a espécie *A. diaperinus* (e outras similares como *T. molitor*) apresenta-se como uma melhor alternativa pois nos preparados onde ela foi incorporada o seu sabor não é notório, prevalecendo os sabores associados às restantes matérias-primas e aromatizações utilizadas. Este efeito é especialmente evidente nas comparações com produtos análogos sem incorporação de insetos (Figs. 16-19) onde não houve diferenças significativas ao nível de aparência, aroma, sabor, aceitação global ou atitude de compra. No entanto, foi possível detetar que as texturas dos produtos com insetos tiveram avaliações relativamente baixas (Fig. 14), sendo essa a única característica que diferenciou os produtos com *A. diaperinus* e análogos sem inseto (Figs. 17-20). Mesmo tendo em conta que os produtos provados (20% preparado + 80 % iogurte Mimosa Natural) continham no máximo 4% de farinha de inseto, esta conferia aos produtos uma textura adstringente que não é naturalmente associada a iogurtes. Além deste efeito na textura, a própria utilização de farinha de inseto apresentou problemas na elaboração dos preparados pois a sua diluição em água era extremamente complicada e os preparados por diversas vezes ficavam com texturas muito espessas. Apesar de alguns resultados promissores com a utilização de *A. diaperinus*, ainda são necessários mais estudos para o desenvolvimento deste tipo de produtos, nomeadamente técnicas que consigam diminuir a granulometria da farinha de insetos (podendo possivelmente transformá-la num pó) de modo a diminuir o efeito que têm na textura.

É preciso também salientar que as provas sensoriais realizadas apresentaram algumas limitações, como o número bastante baixo de provadores (tabela 15) ou o facto de as provas não serem realizadas individualmente o que pode ter influenciado as respostas de alguns provadores. Mais análises sensoriais, com um número maior de provadores e num ambiente controlado são necessários para validar estes resultados iniciais. Também será benéfico avaliar como varia a aceitação dos consumidores ao serem informados das espécies de insetos que estão presentes, pois pode ocorrer que a presença de larvas de *A. diaperinus* leve a uma rejeição do produto sem sequer o consumir, algo que pode ocorrer em menor extensão com a presença de grilos.

No desenvolvimento do projeto efetuado em parceria com a Frulact também se efetuaram testes de segurança alimentar, nomeadamente quantificação da carga microbiológica das espécies de inseto utilizadas (*A. diaperinus*, *A. domesticus* e *G. sigillatus*) e preparados elaborados com incorporação dos insetos. Esta análise é de extrema importância, pois como foi referido anteriormente a carga microbiológica dos insetos é um dos pontos mais críticos na sua segurança como ingrediente alimentar. Apesar de não serem detetadas espécies patogénicas como *L. monocytogenes*, *C. perfringens*, *Salmonella* e *Vibrio* [79-82], há estudos relatam níveis altos de contagem aeróbica total, contagem anaeróbica total e *Enterobacteriaceae* [76-80].

Antes de mais, é importante salientar a limitação da análise feita, pois não foi possível quantificar a espécie *A. diaperinus* em termos de mesófilos totais, bactérias formadoras de esporos aeróbias mesófilas e termófilas pois para todas as diluições utilizadas as placas estavam incontáveis. Deveriam ter sido efetuadas novas análise com diluições mais altas, mas tal não foi possível devido a restrições de tempo disponível.

Relativamente á quantificação da carga microbiológica das espécies de inseto utilizadas (Fig. 22), foi possível verificar que as espécies de grilo em estudo estavam contaminadas em termos de mesófilos totais (com quantificações a chegar até $4,0 \pm 0,2$ lg(UFC/g) para *A. domesticus*), sendo os valores equiparáveis ou até menores do que aqueles encontrados para estas espécies [80, 204]. Estas espécies também estavam contaminadas com bactérias formadoras de esporos aeróbias mesófilas com valores a chegar até $3,0 \pm 0,1$ lg(UFC/g) para *G. sigillatus*, o que pode ser preocupante pois estes valores podem indicar a presença de *B. cereus*. Outro dado que pode causar preocupação é a quantificação de bactérias formadoras de esporos anaeróbias mesófilas de *A. diaperinus* ($4,0 \pm 0,04$ lg(UFC/g)), pois também pode indicar a presença da espécie patogénica *C. perfringens*. É porventura importante salientar que na quantificação bactérias formadoras de esporos aeróbias termófilas, a mistura das duas espécies de grilos teve uma quantificação de $3,0 \pm 0,1$ lg(UFC/g) apesar de na análise destas espécies não ter sido quantificado bactérias formadoras de esporos aeróbias termófilas.

As análises microbiológicas efetuadas aos preparados revelaram que estes não cumprem os requisitos internos de segurança alimentar impostos pela Frulact. Na análise de mesófilos totais (Fig. 24), esporulados aeróbios mesófilos (Fig. 25) e termófilos (Fig. 26) é possível verificar que os preparados com incorporação de *A. diaperinus* têm geralmente quantificações mais levadas (havendo até casos onde a

quantificação foi só possível nesses preparados), podendo-se colocar a hipótese que a inclusão desta espécie aumenta a carga microbiológica do preparado. Foi também possível quantificar fungos filamentosos em dois preparados (Avelã e Mel-Noz com incorporação de *A. diaperinus*), mas esta quantificação pode não ter sido devida à espécie de inseto utilizada pois na análise dos fungos filamentosos das espécies de insetos (Fig. 23) as quantificações ficaram abaixo do limite de deteção (2 lg (UFC/g)). Assim, esta quantificação pode dever-se às outras matérias primas utilizadas (também improvável pois os preparados de Avelã e Mel-Noz com incorporação de grilo não estavam contaminados com fungos filamentosos) ou devido a más condições de armazenamento que podem ter levado a contaminações ambientais.

Parece evidente que mais esforços são necessários para estudar e garantir a segurança microbiológica de produtos com incorporação de insetos antes de se avançar com a sua comercialização. Nomeadamente para mitigar a carga microbiológica dos insetos podem ser feitos tratamentos (como cozimento, fritura, pulverização) aos insetos de modo a diminuir a sua carga microbiológica, como é visto em artigos que estudam o efeito destas técnicas na segurança microbiológica de insetos [43, 76, 78, 83, 84]. Outra técnica que pode ser implementada é uma alteração no binómio de tempo-temperatura utilizado (90°C/ 5 min), que pode ser especialmente útil na diminuição da carga microbiológica de esporulados. Seria também importante fazer-se uma comparação das cargas microbiológicas destes produtos com incorporação de insetos com outros análogos sem incorporação de insetos, de modo a avaliar o efeito destes na carga microbiológica dos preparados. Outro ponto que também deve ter sido em conta é que será necessário aprofundar o conhecimento sobre o tipo de bactérias presentes nos insetos e produtos, especialmente as espécies de bactérias formadoras de esporos *B. cereus* e *C. perfringens*.

12. Conclusão geral

O desenvolvimento deste projeto abrangeu diversas áreas relacionadas com a entomofagia (segurança alimentar, extração proteica e lipídica, análise nutricional e sensorial, desenvolvimento de produtos) tendo sido possível obter resultados satisfatórios que irão não só acrescentar conhecimento científico, mas que também poderão ser úteis para a aplicação de insetos na indústria alimentar.

A revisão sistemática realizada sobre os perigos alergénicos do consumo de insetos permitiu identificar dois grupos de risco: pessoas alérgicas a crustáceos (reatividade cruzada mediada por principalmente tropomiosina e AC) e pessoas constantemente expostas a insetos (sensitização primária), enquanto o risco para pessoas alérgicas a ácaros ainda não se encontra definido. No entanto este não foi o único risco de segurança alimentar identificado neste projeto, visto que as espécies de inseto e produtos elaborados na Frulact se encontravam contaminados microbiologicamente a níveis superiores aos tolerados pela empresa, indicando que são necessários tratamentos adicionais aos insetos e produtos. Por outro lado, não foram detetados elementos perigosos para o consumidor como Pb, As ou Cd, nas espécies de grilos estudadas.

Relativamente à elaboração de produtos alimentares com incorporação de insetos, foi possível detetar que a inclusão de grilos teve efeitos negativos no sabor e aceitabilidade geral dos produtos quer nas barras de cereais e frutos secos quer nos produtos elaborados na Frulact. Com a extração da fração lipídica dos insetos com etanol, foi possível mitigar esses efeitos sensoriais negativos (como foi verificado pelas provas sensoriais efetuadas com resíduo desengordurado), podendo ser esta uma alternativa para melhorar a qualidade sensorial de produtos com incorporação de grilos.

No entanto, além do sabor é também importante resolver a questão da textura da farinha dos insetos principalmente quando os insetos são aplicados em produtos como iogurtes, pois a presença de farinha de inseto causa sensações desagradáveis que podem levar à rejeição do produto mesmo que ele tenha um bom sabor.

13. Disseminação dos resultados

-Publicação do artigo de revisão sistemática em jornal científico internacional:

Ribeiro, J. C., Cunha, L. M., Sousa-Pinto, B., Fonseca, J., Allergic risks of consuming edible insects: A systematic review. *Molecular nutrition & food research*, 2017.

-Comunicação em forma de poster:

Ribeiro, J. C., Cunha, L. M., Sousa-Pinto, B., Fonseca, J., (2017, Setembro) “*Better safe than sorry: Allergenic risks of consuming edible insects: A systematic review*” INSECTA, Berlim, Alemanha

14. Referências bibliográficas

- [1] Boland, M. J., Rae, A. N., Vereijken, J. M., Meuwissen, M. P. M., *et al.*, The future supply of animal-derived protein for human consumption. *Trends. Food Sci. Technol.* 2013, 29, 62-73.
- [2] Alexandratos, N., Bruinsma, J., *World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision. ESA Working Paper 12-03*, Agricultural Development Economics Division Food and Agriculture Organisation of the United Nations 2012.
- [3] Msangi, S., Rosegrant, M. W., *2020 Conference: Leveraging Agriculture for Improving Nutrition and Health*, International Food Policy Research Institute, Washington, DC 2011, pp. 65-71.
- [4] Paoletti, M. G., Dreon, A., in: Paoletti, M. (Ed.), *Ecological Implications of Minilivestock: Potential of Insects, Rodents, Frogs and Sails*, Science Publisher, Enfield, N.H 2005, pp. 1-18.
- [5] van Huis, A., Edible insects are the future? *Proc. Nutr. Soc.* 2016, 75, 294-305.
- [6] Gerber, P., Steinfeld, H., Henderson, B., *Tackling Climate Change through Livestock - A global assessment of emissions and mitigation opportunities*, Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO), Rome 2013.
- [7] Steinfeld, H., Gerber, P. W., T., Castel, V., Rosales, M., *Livestock's Long Shadow: Environmental Issues and Options*, Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome 2006.
- [8] Beusen, A. H. W., Bouwman, A. F., Heuberger, P. S. C., Van Drecht, G., Van Der Hoek, K. W., Bottom-up uncertainty estimates of global ammonia emissions from global agricultural production systems. *Atmospheric Environment* 2008, 42, 6067-6077.
- [9] King, D. A., Peckham, C., Waage, J. K., Brownlie, J., Woolhouse, M. E., Epidemiology. Infectious diseases: preparing for the future. *Science (New York, N.Y.)* 2006, 313, 1392-1393.
- [10] Tomley, F. M., Shirley, M. W., Livestock infectious diseases and zoonoses. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 2009, 364, 2637-2642.
- [11] Aykan, N. F., Red Meat and Colorectal Cancer. *Oncology Reviews* 2015, 9, 288.
- [12] Pan, A., Sun, Q., Bernstein, A. M., Schulze, M. B., *et al.*, Red meat consumption and mortality: results from 2 prospective cohort studies. *Arch. Intern. Med.* 2012, 172, 555-563.
- [13] Pimentel, D., Pimentel, M., Sustainability of meat-based and plant-based diets and the environment. *Am. J. Clin. Nutr.* 2003, 78, 660s-663s.

- [14] Ramos-Elorduy, J., Energy Supplied by Edible Insects from Mexico and their Nutritional and Ecological Importance. *Ecol. Food Nutr.* 2008, *47*, 280-297.
- [15] Nelson, G. C., Rosegrant, M. W., Koo, J., Robertson, R. D., *et al.*, *Climate change: Impact on agriculture and costs of adaptation*, International Food Policy Research Institute (IFPRI), Washington, D.C. 2009.
- [16] Alston, J. M., Beddow, J. M., Pardey, P. G., Agriculture. Agricultural research, productivity, and food prices in the long run. *Science (New York, N.Y.)* 2009, *325*, 1209-1210.
- [17] Burlingame, B., Dernini, S., *Sustainable Diets and Biodiversity - Directions and solutions for policy, research and action*, Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome 2012.
- [18] Eisler, M. C., Lee, M. R., Tarlton, J. F., Martin, G. B., *et al.*, Agriculture: Steps to sustainable livestock. *Nature* 2014, *507*, 32-34.
- [19] van der Spiegel, M., Noordam, M. Y., van der Fels-Klerx, H. J., Safety of Novel Protein Sources (Insects, Microalgae, Seaweed, Duckweed, and Rapeseed) and Legislative Aspects for Their Application in Food and Feed Production. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2013, *12*, 662-678.
- [20] Sponheimer, M., de Ruiter, D., Lee-Thorp, J., Spath, A., Sr/Ca and early hominin diets revisited: new data from modern and fossil tooth enamel. *J. Hum. Evol.* 2005, *48*, 147-156.
- [21] van Huis, A., Van Itterbeeck, J., Klunder, H. C., Mertens, E., *et al.*, *Edible insects: future prospects for food and feed security*, FAO, Rome 2013.
- [22] Randrianandrasana, M., Berenbaum, M. R., Edible Non-Crustacean Arthropods in Rural Communities of Madagascar. *J. Ethnobiol.* 2015, *35*, 354-383.
- [23] Bukkens, S. G. F., The nutritional value of edible insects. *Ecol. Food Nutr.* 1997, *36*, 287-319.
- [24] Nonaka, K., Feasting on insects. *Entomol. Res.* 2009, *39*, 304-312.
- [25] van Huis, A., Insects as Food in sub-Saharan Africa. *Insect Sci. Appl.* 2011, *23*, 163-185.
- [26] Yen, A. L., Edible insects and other invertebrates in Australia: future prospects. *Forest insects as food: humans bite back. Proceedings of a workshop on Asia-Pacific resources and their potential for development*, , Chiang Mai, Thailand, 2008
- [27] Dzerefos, C. M., Witkowski, E. T. F., Crunchtime: sub-Saharan stinkbugs, a dry season delicacy and cash cow for impoverished rural communities. *Food Security* 2015, *7*, 919-925.

- [28] Lesnik, J. J., Not just a fallback food: global patterns of insect consumption related to geography, not agriculture. *Am. J. Hum. Biol.* 2017, 29.
- [29] Belluco, S., Halloran, A., Ricci, A., New protein sources and food legislation: the case of edible insects and EU law. *Food Security* 2017, 9, 803-814.
- [30] Schluter, O., Rumpold, B., Holzhauser, T., Roth, A., *et al.*, Safety aspects of the production of foods and food ingredients from insects. *Mol. Nutr. Food Res.* 2017, 61.
- [31] Harris, M., *Good to Eat: Riddles of Food and Culture*, Waveland Press, Long Grove, IL, U.S.A 1998.
- [32] DeFoliart, G. R., Insects as food: why the western attitude is important. *Annu. Rev. Entomol.* 1999, 44, 21-50.
- [33] Ruby, M. B., Rozin, P., Chan, C., Determinants of willingness to eat insects in the USA and India. *Journal of Insects as Food and Feed* 2015, 1, 215-225.
- [34] Ramos-Elorduy, J., Insects: A sustainable source of food? *Ecol. Food Nutr.* 1997, 36, 247-276.
- [35] Yen, A. L., Edible insects: Traditional knowledge or western phobia? *Entomol. Res.* 2009, 39, 289-298.
- [36] Taponen, I., Entomology Company Database (2017). <https://ilkkataponen.com/entomology-company-database/>, 24 Setembro 2017
- [37] Yi, L., Boekel, M. A. J. S. V., Lakemond, C. M. M., Extracting *Tenebrio molitor* protein while preventing browning: effect of pH and NaCl on protein yield. *Journal of Insects as Food and Feed* 2017, 3, 21-31.
- [38] Yi, L., Lakemond, C. M., Sagis, L. M., Eisner-Schadler, V., *et al.*, Extraction and characterisation of protein fractions from five insect species. *Food Chem.* 2013, 141, 3341-3348.
- [39] Zhao, X., Vazquez-Gutierrez, J. L., Johansson, D. P., Landberg, R., Langton, M., Yellow Mealworm Protein for Food Purposes - Extraction and Functional Properties. *PLoS One* 2016, 11, e0147791.
- [40] Ramos-Bueno, R. P., González-Fernandez, M. J., Sánchez-Muros-Lozano, M. J., García-Barroso, F., Guil-Guerreo, J. L., Fatty acid profiles and cholesterol content of seven insect species assessed by several extraction systems. *Eur. Food Res. Technol.* 2016, 242, 1471-1477.
- [41] Tzompa-Sosa, D. A., Yi, L., van Valenberg, H. J. F., van Boekel, M. A. J. S., Lakemond, C. M. M., Insect lipid profile: aqueous versus organic solvent-based extraction methods. *Food Res. Int.* 2014, 62, 1087-1094.

- [42] Mariod, A. A., Fadul, H., Extraction and characterization of gelatin from two edible Sudanese insects and its applications in ice cream making. *Food Sci. Technol. Int.* 2015, 21, 380-391.
- [43] EFSA, Risk profile related to production and consumption of insects as food and feed. *EFSA J.* 2015, 13, 4257-4317.
- [44] Hamodrakas, S. J., Willis, J. H., Iconomidou, V. A., A structural model of the chitin-binding domain of cuticle proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2002, 32, 1577-1583.
- [45] Shahidi, F., Arachchi, J. K. V., Jeon, Y.-J., Food applications of chitin and chitosans. *Trends Food Sci. Technol.* 1999, 10, 37-51.
- [46] Sabolová, M., Adámková, A., Kouřimská, L., Chrpová, D., Pánek, J., Minor lipophilic compounds in edible insects. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences* 2016, 10, 1.
- [47] van Huis, A., Potential of insects as food and feed in assuring food security. *Annu. Rev. Entomol.* 2013, 58, 563-583.
- [48] Adámková, A., Kouřimská, L., Borkovcová, M., Kulma, M., Miček, J., Nutritional values of edible Coleoptera (*Tenebrio molitor*, *Zophobas morio* and *Alphitobius diaperinus*) reared in the Czech Republic. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences* 2016, 10.
- [49] Finke, M. D., Complete nutrient composition of commercially raised invertebrates used as food for insectivores. *Zoo biology* 2002, 21, 269-285.
- [50] Finke, M. D., Estimate of chitin in raw whole insects. *Zoo Biol.* 2007, 26, 105-115.
- [51] Kim, S.-K., Weaver, C. M., Choi, M.-K., Proximate composition and mineral content of five edible insects consumed in Korea. *CyTA J. Food* 2017, 15, 143-146.
- [52] Bednarova, M., Borkovcova, M., Mlcek, J., Rop, O., Edible insects - species suitable for entomophagy under condition of Czech Republic. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis* 2013, 61, 587-593.
- [53] Zielińska, E., Baraniak, B., Karaś, M., Rybczyńska, K., Jakubczyk, A., Selected species of edible insects as a source of nutrient composition. *Food Res. Int.* 2015, 77, 460-466.
- [54] Marono, S., Piccolo, G., Loponte, R., Di Meo, C., *et al.*, In Vitro Crude Protein Digestibility of *Tenebrio Molitor* and *Hermetia Illucens* Insect Meals and its Correlation with Chemical Composition Traits. *Ital. J. Anim. Sci.* 2015, 14, 3889.
- [55] Ravzanaadii, N., Kim, S.-H., Choi, W.-H., Hong, S.-J., Kim, N.-J., Nutritional Value of Mealworm, *Tenebrio molitor* as Food Source. *Int. J. Indust. Entomol.* 2012, 25, 93-98.

- [56] Belluco, S., Losasso, C., Maggioletti, M., Alonzi, C. C., *et al.*, Edible Insects in a Food Safety and Nutritional Perspective: A Critical Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2013, 12, 296-313.
- [57] Finke, M. D., Complete nutrient composition of commercially raised invertebrates used as food for insectivores. *Zoo Biol.* 2002, 21, 269-285.
- [58] Tessari, P., Lante, A., Mosca, G., Essential amino acids: master regulators of nutrition and environmental footprint? *Scientific Reports* 2016, 6, 26074.
- [59] Kouřimská, L., Adámková, A., Nutritional and sensory quality of edible insects. *NFS J.* 2016, 4, 22-26.
- [60] Ramos-Elorduy, J., Moreno, J. M. P., Prado, E. E., Perez, M. A., *et al.*, Nutritional Value of Edible Insects from the State of Oaxaca, Mexico. *J. Food Composit. Anal.* 1997, 10, 142-157.
- [61] Rumpold, B. A., Schluter, O. K., Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Mol. Nutr. Food Res.* 2013, 57, 802-823.
- [62] Donnelly, J. K., Robinson, D. S., Free radicals in foods. *Free Radic. Res.* 1995, 22, 147-176.
- [63] Simopoulos, A. P., An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. *Nutrients* 2016, 8, 128.
- [64] Muller, O., Krawinkel, M., Malnutrition and health in developing countries. *CMAJ.* 2005, 173, 279-286.
- [65] Barker, D., Fitzpatrick, M. P., Dierenfeld, E. S., Nutrient composition of selected whole invertebrates. *Zoo Biol.* 1998, 17, 123-134.
- [66] Adámková, A., Kouřimská, L., Borkovcova, M., Mlcek, J., Bednarova, M., Calcium in edible insects and its use in human nutrition. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences* 2014, 8.
- [67] FAO, *Vitamin And Mineral Requirements in Human Nutrition*, Report of a joint FAO/WHO expert consultation, Bangkok 2004.
- [68] Hidgon, J., Drake, V. J., *An Evidence-Based Approach to Vitamins and Minerals - Health Benefits and Intake Recommendations*, Thieme, Estugarda, Alemanha 2011.
- [69] Oonincx, D. G., van Itterbeeck, J., Heetkamp, M. J., van den Brand, H., *et al.*, An exploration on greenhouse gas and ammonia production by insect species suitable for animal or human consumption. *PLoS One* 2010, 5, e14445.
- [70] Oonincx, D. G. A. B., de Boer, I. J. M., Environmental Impact of the Production of Mealworms as a Protein Source for Humans – A Life Cycle Assessment. *PLoS ONE* 2012, 7, e51145.

- [71] Tabassum, A., Abbasi, T., Abbasi, S. A., Reducing the global environmental impact of livestock production: the minilivestock option. *J. Clean. Prod.* 2016, 112, 1754-1766.
- [72] Gustavsson, J., Cederberg, C., Sonesson, U., van Otterdijk, R., Meybeck, A., *Global Food Losses and Food Waste: Extent, Causes and Prevention*, FAO, Rome 2011.
- [73] Bogner, J., Pipatti, R., Hashimoto, S., Diaz, C., *et al.*, Mitigation of global greenhouse gas emissions from waste: conclusions and strategies from the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) Fourth Assessment Report. Working Group III (Mitigation). *Waste management & research : the journal of the International Solid Wastes and Public Cleansing Association, ISWA* 2008, 26, 11-32.
- [74] Arukwe, A., Eggen, T., Moder, M., Solid waste deposits as a significant source of contaminants of emerging concern to the aquatic and terrestrial environments - a developing country case study from Owerri, Nigeria. *Sci. Total Environ.* 2012, 438, 94-102.
- [75] Cerritos, R., Insects as food: an ecological, social and economical approach. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* 2009, 4, 1-10.
- [76] Caparros Megido, R., Desmedt, S., Blecker, C., Béra, F., *et al.*, Microbiological Load of Edible Insects Found in Belgium. *Insects* 2017, 8, 12.
- [77] FASFC, Food safety aspects of insects intended for human consumption (SciC om dossier 2014/04; SHC dossier n° 9160). 2014.
- [78] Klunder, H. C., Wolkers-Rooijackers, J., Korpela, J. M., Nout, M. J. R., Microbiological aspects of processing and storage of edible insects. *Food Control* 2012, 26, 628-631.
- [79] NVWA, Advisory report on the risks associated with the consumption of mass-reared insects. *Zenodo* 2014.
- [80] Vandeweyer, D., Crauwels, S., Lievens, B., Van Campenhout, L., Microbial counts of mealworm larvae (*Tenebrio molitor*) and crickets (*Acheta domesticus* and *Gryllobates sigillatus*) from different rearing companies and different production batches. *Int. J. Food Microbiol.* 2017, 242, 13-18.
- [81] Grabowski, N. T., Klein, G., Microbiology of cooked and dried edible Mediterranean field crickets (*Gryllus bimaculatus*) and superworms (*Zophobas atratus*) submitted to four different heating treatments. *Food Sci. Technol. Int.* 2017, 23, 17-23.
- [82] Osimani, A., Garofalo, C., Milanović, V., Taccari, M., *et al.*, Insight into the proximate composition and microbial diversity of edible insects marketed in the European Union. *Eur. Food Res. Technol.* 2017, 243, 1157-1171.

- [83] Rumpold, B. A., Fröhling, A., Reineke, K., Knorr, D., *et al.*, Comparison of volumetric and surface decontamination techniques for innovative processing of mealworm larvae (*Tenebrio molitor*). *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 2014, 26, 232-241.
- [84] Vandeweyer, D., Lenaerts, S., Callens, A., Van Campenhout, L., Effect of blanching followed by refrigerated storage or industrial microwave drying on the microbial load of yellow mealworm larvae (*Tenebrio molitor*). *Food Control* 2017, 71, 311-314.
- [85] Schabel, H. G., Forest insects as food: A global review. *Edible Forest Insects: Humans Bite Back, Proceedings of a Workshop on Asia-Pacific Resources and Their Potential for Developmente*, Bangkok, Thailand, 2010
- [86] Eilenberg, J., Vlak, J. M., Nielsen-LeRoux, C., Cappellozza, S., Jensen, A. B., Diseases in insects produced for food and feed. *Journal of Insects as Food and Feed* 2015, 1, 87-102.
- [87] Pereira, N. R., Tarley, C. R. T., Matsushita, M., de Souza, N. E., Proximate Composition and Fatty Acid Profile in Brazilian Poultry Sausages. *J. Food Composit. Anal.* 2000, 13, 915-920.
- [88] Zimmermann, G., Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Sci. Technol.* 2007, 17, 553-596.
- [89] Zimmermann, G., Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Sci. Technol.* 2007, 17, 879-920.
- [90] Post, K., Riesner, D., Walldorf, V., Mehlhorn, H., Fly larvae and pupae as vectors for scrapie. *Lancet (London, England)* 1999, 354, 1969-1970.
- [91] Thackray, A. M., Muhammad, F., Zhang, C., Denyer, M., *et al.*, Prion-induced toxicity in PrP transgenic *Drosophila*. *Exp. Mol. Pathol.* 2012, 92, 194-201.
- [92] Handley, M. A., Hall, C., Sanford, E., Diaz, E., *et al.*, Globalization, binational communities, and imported food risks: results of an outbreak investigation of lead poisoning in Monterey County, California. *Am. J. Public Health* 2007, 97, 900-906.
- [93] Vijver, M., Jager, T., Posthuma, L., Peijnenburg, W., Metal uptake from soils and soil-sediment mixtures by larvae of *Tenebrio molitor* (L.) (Coleoptera). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2003, 54, 277-289.
- [94] Zhuang, P., Zou, H., Shu, W., Biotransfer of heavy metals along a soil-plant-insect-chicken food chain: field study. *J. Environ. Sci.* 2009, 21, 849-853.
- [95] Walters, D. M., Mills, M. A., Fritz, K. M., Raikow, D. F., Spider-Mediated Flux of PCBs from Contaminated Sediments to Terrestrial Ecosystems and Potential Risks to Arachnivoracious Birds. *Environ. Sci. Technol.* 2010, 44, 2849-2856.

- [96] Gaylor, M. O., Harvey, E., Hale, R. C., House crickets can accumulate polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) directly from polyurethane foam common in consumer products. *Chemosphere* 2012, *86*, 500-505.
- [97] Poma, G., Cuykx, M., Amato, E., Calaprice, C., *et al.*, Evaluation of hazardous chemicals in edible insects and insect-based food intended for human consumption. *Food Chem. Toxicol.* 2017, *100*, 70-79.
- [98] Demain, J. G., Minaei, A. A., Tracy, J. M., Anaphylaxis and insect allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2010, *10*, 318-322.
- [99] Barletta, B., Pini, C., Does occupational exposure to insects lead to species-specific sensitization? *Allergy* 2003, *58*, 868-870.
- [100] Stanhope, J., Carver, S., Weinstein, P., The risky business of being an entomologist: A systematic review. *Environ. Res.* 2015, *140*, 619-633.
- [101] Suarathana, E., Shen, A., Henneberger, P. K., Kreiss, K., *et al.*, Post-hire asthma among insect-rearing workers. *J. Occup. Environ. Med.* 2012, *54*, 310-317.
- [102] Sheehan, W. J., Phipatanakul, W., Difficult-to-control asthma: epidemiology and its link with environmental factors. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2015, *15*, 397-401.
- [103] Bernstein, D. I., Gallagher, J. S., Bernstein, I. L., Mealworm asthma: clinical and immunologic studies. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1983, *72*, 475-480.
- [104] Bagenstose, A. H., Mathews, K. P., Homburger, H. A., Saaveard-Delgado, A. P., Inhalant allergy due to crickets. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1980, *65*, 71-74.
- [105] Lopata, A. L., Fenemore, B., Jeebhay, M. F., Gade, G., Potter, P. C., Occupational allergy in laboratory workers caused by the African migratory grasshopper *Locusta migratoria*. *Allergy* 2005, *60*, 200-205.
- [106] Verhoeckx, K., Broekman, H., Knulst, A., Houben, G., Allergenicity assessment strategy for novel food proteins and protein sources. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2016, *79*, 118-124.
- [107] Lopata, A. L., O'Hehir, R. E., Lehrer, S. B., Shellfish allergy. *Clin. Exp. Allergy* 2010, *40*, 850-858.
- [108] Heinzerling, L. M., Burbach, G. J., Edenharter, G., Bachert, C., *et al.*, GA(2)LEN skin test study I: GA(2)LEN harmonization of skin prick testing: novel sensitization patterns for inhalant allergens in Europe. *Allergy* 2009, *64*, 1498-1506.
- [109] Pennisi, E., Evolution. All in the (bigger) family. *Sci. Total. Environ.* 2015, *347*, 220-221.
- [110] Ayuso, R., Reese, G., Leong-Kee, S., Plante, M., Lehrer, S. B., Molecular basis of arthropod cross-reactivity: IgE-binding cross-reactive epitopes of shrimp, house dust mite and cockroach tropomyosins. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2002, *129*, 38-48.

- [111] Binder, M., Mahler, V., Hayek, B., Sperr, W. R., *et al.*, Molecular and immunological characterization of arginine kinase from the Indianmeal moth, *Plodia interpunctella*, a novel cross-reactive invertebrate pan-allergen. *J. Immunol.* 2001, *167*, 5470-5477.
- [112] Crespo, J. F., Pascual, C., Helm, R., Sanchez-Pastor, S., *et al.*, Cross-reactivity of IgE-binding components between boiled Atlantic shrimp and German cockroach. *Allergy* 1995, *50*, 918-924.
- [113] Santos, A. B., Chapman, M. D., Aalberse, R. C., Vailes, L. D., *et al.*, Cockroach allergens and asthma in Brazil: identification of tropomyosin as a major allergen with potential cross-reactivity with mite and shrimp allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1999, *104*, 329-337.
- [114] Witteman, A. M., Akkerdaas, J. H., van Leeuwen, J., van der Zee, J. S., Aalberse, R. C., Identification of a cross-reactive allergen (presumably tropomyosin) in shrimp, mite and insects. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1994, *105*, 56-61.
- [115] Hartmann, C., Siegrist, M., Becoming an insectivore: Results of an experiment. *Food Qual. Pref.* 2016, *51*, 118-122.
- [116] Pliner, P., Hobden, K., Development of a scale to measure the trait of food neophobia in humans. *Appetite* 1992, *19*, 105-120.
- [117] Fallon, A. E., Rozin, P., The psychological bases of food rejections by humans. *Ecol. Food Nutr.* 1983, *13*, 15-26.
- [118] Tuorila, H., Meiselman, H. L., Bell, R., Cardello, A. V., Johnson, W., Role of sensory and cognitive information in the enhancement of certainty and liking for novel and familiar foods. *Appetite* 1994, *23*, 231-246.
- [119] Hartmann, C., Shi, J., Giusto, A., Siegrist, M., The psychology of eating insects: A cross-cultural comparison between Germany and China. *Food Qual. Pref.* 2015, *44*, 148-156.
- [120] Vanhonacker, F., Van Loo, E. J., Gellynck, X., Verbeke, W., Flemish consumer attitudes towards more sustainable food choices. *Appetite* 2013, *62*, 7-16.
- [121] Verbeke, W., Profiling consumers who are ready to adopt insects as a meat substitute in a Western society. *Food Qual. Pref.* 2015, *39*, 147-155.
- [122] Chapman, H. A., Anderson, A. K., Understanding disgust. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2012, *1251*, 62-76.
- [123] Rozin, P., Millman, L., Nerneroff, C., Operation of the laws of sympathetic magic in disgust and other domains. *J. Pers. Soc. Psychol.* 1986, *50*, 703-712.
- [124] Tan, H. S. G., Fischer, A. R. H., van Trijp, H. C. M., Stieger, M., Tasty but nasty? Exploring the role of sensory-liking and food appropriateness in the willingness to eat unusual novel foods like insects. *Food Qual. Pref.* 2016, *48*, 293-302.

- [125] Deroy, O., Reade, B., Spence, C., The insectivore's dilemma, and how to take the West out of it. *Food Qual. Pref.* 2015, *44*, 44-55.
- [126] Rotfeld, H. J., Health Information Consumers Can't or Don't Want to Use. *J. Consum. Aff.* 2009, *43*, 373-377.
- [127] House, J., Consumer acceptance of insect-based foods in the Netherlands: Academic and commercial implications. *Appetite* 2016, *107*, 47-58.
- [128] Gmuer, A., Nuessli Guth, J., Hartmann, C., Siegrist, M., Effects of the degree of processing of insect ingredients in snacks on expected emotional experiences and willingness to eat. *Food Qual. Pref.* 2016, *54*, 117-127.
- [129] Caparros Megido, R., Gierts, C., Blecker, C., Danthine, S., *et al.*, Consumer acceptance of insect-based alternative meat products in Western countries. *Food Qual. Pref.* 2016, *52*, 237-243.
- [130] Caparros Megido, R., Sablon, L., Geuens, M., Brostaux, Y., *et al.*, Edible Insects Acceptance by Belgian Consumers: Promising Attitude for Entomophagy Development. *J. Sens. Stud.* 2014, *29*, 14-20.
- [131] Schösler, H., Boer, J. d., Boersema, J. J., Can we cut out the meat of the dish? Constructing consumer-oriented pathways towards meat substitution. *Appetite* 2012, *58*, 39-47.
- [132] Cardello, A. V., Schutz, H. G., Snow, C., Leshner, L., Predictors of Food Acceptance, Consumption and Satisfaction in Specific Eating Situations. *Food Qual. Pref.* 2000, *11*, 201-216.
- [133] Schutz, H. G., Martens, M., in: Springer (Ed.), *Food, People and Society*. 2001, pp. 247-266.
- [134] Tan, H. S., Verbaan, Y. T., Stieger, M., How will better products improve the sensory-liking and willingness to buy insect-based foods? *Food Res. Int.* 2017, *92*, 95-105.
- [135] Post, M. J., Cultured meat from stem cells: Challenges and prospects. *Meat Sci.* 2012, *92*, 297-301.
- [136] Harrison-Dunn, A.-R., Alternative snack protein "Hybrid" meat wins over insects, lentils and seaweed (2014).[^]<http://www.bakeryandsnacks.com/Ingredients/Alternative-snack-protein-Hybrid-meat-wins-over-insects-lentils-and-seaweed>, 24 Setembro 2017
- [137] Pelchat, M. L., Pliner, P., "Try it. You'll like it." Effects of information on willingness to try novel foods. *Appetite* 1995, *24*, 153-165.
- [138] Steptoe, A., Pollard, T. M., Wardle, J., Development of a measure of the motives underlying the selection of food: the food choice questionnaire. *Appetite* 1995, *25*, 267-284.

- [139] Horgen, K. B., Brownell, K. D., Comparison of price change and health message interventions in promoting healthy food choices. *Health Psychol.* 2002, *21*, 505-512.
- [140] Tuorila, H., Cardello, A. V., Consumer responses to an off-flavor in juice in the presence of specific health claims. *Food Qual. Pref.* 2002, *13*, 561-569.
- [141] Tan Hui Shan, G., Berg, E. v. d., Stieger, M., The influence of product preparation, familiarity and individual traits on the consumer acceptance of insects as food. *Food Qual. Pref.* 2016, *52*, 222-231.
- [142] Tan, H. S. G., Fischer, A. R. H., Tinchon, P., Stieger, M., *et al.*, Insects as food: Exploring cultural exposure and individual experience as determinants of acceptance. *Food Qual. Pref.* 2015, *42*, 78-89.
- [143] Broekman, H., Knulst, A., Den Hartog Jager, S., Monteleone, F., *et al.*, Effect of thermal processing on mealworm allergenicity. *Mol. Nutr. Food Res.* 2015, *59*, 1855-1864.
- [144] Broekman, H., Verhoeckx, K. C., Jager, C. F. D., Kruizinga, A. G., *et al.*, Majority of shrimp-allergic patients are allergic to mealworm. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2016, *137*, 1261-+.
- [145] Leung, P. S. C., Wing Kuen, C., Duffey, S., Hoi Shan, K., *et al.*, IgE reactivity against a cross-reactivity allergen in crustacea and mollusca: Evidence for tropomyosin as the common allergen. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1996, *98*, 954-961.
- [146] Linares, T., Hernandez, D., Bartolome, B., Occupational rhinitis and asthma due to crickets. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2008, *100*, 566-569.
- [147] Phiriyangkul, P., Srinroch, C., Srisomsap, C., Chokchaichamnankit, D., Punyarit, P., Effect of Food Thermal Processing on Allergenicity Proteins in Bombay Locust (*Patanga Succincta*). *Int. J. Food Eng.* 2015, *1*, 23-28.
- [148] Srinroch, C., Srisomsap, C., Chokchaichamnankit, D., Punyarit, P., Phiriyangkul, P., Identification of novel allergen in edible insect, *Gryllus bimaculatus* and its cross-reactivity with *Macrobrachium* spp. allergens. *Food Chem.* 2015, *184*, 160-166.
- [149] Van Broekhoven, S., Bastiaan-Net, S., De Jong, N. W., Wichers, H. J., Influence of processing and in vitro digestion on the allergic cross-reactivity of three mealworm species. *Food Chem.* 2016, *196*, 1075-1083.
- [150] Verhoeckx, K. C. M., van Broekhoven, S., den Hartog-Jager, C. F., Gaspari, M., *et al.*, House dust mite (Der p 10) and crustacean allergic patients may react to food containing Yellow mealworm proteins. *Food Chem. Toxicol.* 2014, *65*, 364-373.
- [151] Jeong, K. Y., Son, M., Lee, J. Y., Park, K. H., *et al.*, Allergenic characterization of 27-kDa glycoprotein, a novel heat stable allergen, from the pupa of silkworm, *Bombyx mori*. *J. Korean Med. Sci.* 2016, *31*, 18-24.

- [152] Liu, Z., Xia, L., Wu, Y., Xia, Q., *et al.*, Identification and characterization of an arginine kinase as a major allergen from silkworm (*Bombyx mori*) larvae. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2009, 150, 8-14.
- [153] Zhao, X., Li, L., Kuang, Z., Luo, G., Li, B., Proteomic and immunological identification of two new allergens from silkworm (*Bombyx mori* L.) pupae. *Cent. Eur. J. Immunol.* 2015, 40, 30-34.
- [154] Broekman, H., Knulst, A., Jager, S. D., Gaspari, M., *et al.*, Insect exposure causes primary food allergy. *Allergy* 2015, 70, 283-283.
- [155] Freye, H. B., Anaphylaxis to the ingestion and inhalation of *Tenebrio molitor* (mealworm) and *Zophobas morio* (superworm). *Allergy Asthma Proc.* 1996, 17, 215-219.
- [156] Gautreau, M., Restuccia, M., Senser, K., Weisberg, S. N., Familial Anaphylaxis after Silkworm Ingestion. *Prehosp. Emerg. Care* 2016, 1-3.
- [157] Kung, S. J., Fenemore, B., Potter, P. C., Anaphylaxis to Mopane worms (*Imbrasia belina*). *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2011, 106, 538-540.
- [158] Kung, S. J., Mazhani, L., Steenhoff, A. P., Allergy in Botswana. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2013, 26, 202-209.
- [159] Okezie, O. A., Kgomotso, K. K., Letswiti, M. M., Mopane worm allergy in a 36-year-old woman: A case report. *J. Med. Case Rep.* 2010, 4.
- [160] Piatt, J. D., Case report: Urticaria following intentional ingestion of cicadas. *American family physician* 2005, 71, 2048, 2050.
- [161] Yew, K. L., Ling Kok, V. S., Exotic food anaphylaxis and the broken heart: Sago worm and Takotsubo cardiomyopathy. *Med. J. Malaysia* 2012, 67, 540-541.
- [162] Choi, G. S., Shin, Y. S., Kim, J. E., Ye, Y. M., Park, H. S., Five cases of food allergy to vegetable worm (*Cordyceps sinensis*) showing cross-reactivity with silkworm pupae. *Allergy* 2010, 65, 1196-1197.
- [163] Ji, K. M., Zhan, Z. K., Chen, J. J., Liu, Z. G., Anaphylactic shock caused by silkworm pupa consumption in China. *Allergy* 2008, 63, 1407-1408.
- [164] Ji, K., Chen, J., Li, M., Liu, Z., *et al.*, Anaphylactic shock and lethal anaphylaxis caused by food consumption in China. *Trends Food Sci. Technol.* 2009, 20, 227-231.
- [165] Jirapongsananuruk, O., Bunsawansong, W., Piyaphanee, N., Visitsunthorn, N., *et al.*, Features of patients with anaphylaxis admitted to a university hospital. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2007, 98, 157-162.
- [166] Piromrat, K., Chinratanapisit, S., Trathong, S., Anaphylaxis in an emergency department: A 2-year study in a tertiary-care hospital. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* 2008, 26, 121-128.

- [167] Barennes, H., Phimmasane, M., Rajaonarivo, C., Insect consumption to address undernutrition, a national survey on the prevalence of insect consumption among adults and vendors in Laos. *PLoS ONE* 2015, 10.
- [168] Asturias, J. A., Gomez-Bayon, N., Arilla, M. C., Martinez, A., *et al.*, Molecular characterization of American cockroach tropomyosin (*Periplaneta americana* allergen 7), a cross-reactive allergen. *J. Immunol.* 1999, 162, 4342-4348.
- [169] Jeong, K. Y., Lee, J., Lee, I. Y., Ree, H. I., *et al.*, Allergenicity of recombinant Bla g 7, German cockroach tropomyosin. *Allergy* 2003, 58, 1059-1063.
- [170] Sookrung, N., Chaicumpa, W., Tungtrongchitr, A., Vichyanond, P., *et al.*, *Periplaneta americana* arginine kinase as a major cockroach allergen among Thai patients with major cockroach allergies. *Environ. Health Perspect.* 2006, 114, 875-880.
- [171] Burmester, T., Origin and evolution of arthropod hemocyanins and related proteins. *J. Comp. Physiol. B.* 2002, 172, 95-107.
- [172] Bannon, G. A., What makes a food protein an allergen? *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2004, 4, 43-46.
- [173] Yi, L., Van Boekel, M. A. J. S., Boeren, S., Lakemond, C. M. M., Protein identification and in vitro digestion of fractions from *Tenebrio molitor*. *Eur. Food Res. Technol.* 2016, 242, 1285-1297.
- [174] Besler, M., Steinhart, H., Paschke, A., Stability of food allergens and allergenicity of processed foods. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 2001, 756, 207-228.
- [175] Liu, G. M., Huang, Y. Y., Cai, Q. F., Weng, W. Y., *et al.*, Comparative study of in vitro digestibility of major allergen, tropomyosin and other proteins between Grass prawn (*Penaeus monodon*) and Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *J. Sci. Food Agric.* 2011, 91, 163-170.
- [176] Wong, L., Huang, C. H., Lee, B. W., Shellfish and House Dust Mite Allergies: Is the Link Tropomyosin? *Allergy, Asthma & Immunol. Res.* 2016, 8, 101-106.
- [177] Sicherer, S. H., Clinical implications of cross-reactive food allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2001, 108, 881-890.
- [178] Peeters, K. A., Nordlee, J. A., Penninks, A. H., Chen, L., *et al.*, Lupine allergy: not simply cross-reactivity with peanut or soy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2007, 120, 647-653.
- [179] Adalsteinsdottir, B., Sigurdardottir, S., Gislason, T., Kristensen, B., Gislason, D., What Characterizes House Dust Mite Sensitive Individuals in a House Dust Mite Free Community in Reykjavik, Iceland? *Allergol. Int.* 2007, 56, 51-56.
- [180] Fernandes, J., Reshef, A., Patton, L., Ayuso, R., *et al.*, Immunoglobulin E antibody reactivity to the major shrimp allergen, tropomyosin, in unexposed Orthodox Jews. *Clin. Exp. Allergy* 2003, 33, 956-961.

- [181] Bessot, J. C., Metz-Favre, C., Rame, J. M., De Blay, F., Pauli, G., Tropomyosin or not tropomyosin, what is the relevant allergen in house dust mite and snail cross allergies? *Eur. Ann. Allergy Clin. Immunol.* 2010, 42, 3-10.
- [182] Guilloux, L., Vuitton, D. A., Delbourg, M., Lagier, A., *et al.*, Cross-reactivity between terrestrial snails (*Helix* species) and house-dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*). II. In vitro study. *Allergy* 1998, 53, 151-158.
- [183] van Ree, R., Antonicelli, L., Akkerdaas, J. H., Pajno, G. B., *et al.*, Asthma after consumption of snails in house-dust-mite-allergic patients: a case of IgE cross-reactivity. *Allergy* 1996, 51, 387-393.
- [184] Ramirez, D. A., Jr., Bahna, S. L., Food hypersensitivity by inhalation. *Clin. Mol. Allergy* 2009, 7, 4.
- [185] Lybarger, J. A., Gallagher, J. S., Pulver, D. W., Litwin, A., *et al.*, Occupational asthma induced by inhalation and ingestion of garlic. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1982, 69, 448-454.
- [186] Boye, J. I., Food allergies in developing and emerging economies: need for comprehensive data on prevalence rates. *Clin. Transl. Allergy* 2012, 2, 25.
- [187] Lee, A. J., Thalayasingam, M., Lee, B. W., Food allergy in Asia: how does it compare? *Asia Pac. Allergy* 2013, 3, 3-14.
- [188] Commission Regulation No 152/2009 Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed. *Official Journal of the European Union* 2009.
- [189] AOAC, Method 988.05 - Protein (crude) in animal feed and pet food: CuSO₄/TiO₂ mixed catalyst Kjeldahl method. 2000.
- [190] Robertson, J. B., Van Soest, P. J., *The Analysis of Dietary Fibre in Food*, NY, USA 1981.
- [191] Folch, J., Lees, M., Stanley, G. H. S., A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957, 226, 497-509.
- [192] Pereira, G. M. *Desenvolvimento de uma barra energética à base de proteína de inseto*, 2016. Licenciatura em Ciências da Engenharia Alimentar, Universidade do Porto
- [193] Cunha, L. M., Gonçalves, A. T. S., Varela, P., Hersleth, M., *et al.*, Adoption of insects as a source for food and feed production: A cross-cultural study on determinants of acceptance. "11th Pangborn Sensory Science Symposium", Gothenburg, Sweden, 2015
- [194] Smyth, J., Dillman, D., Christian, L., Stern, M., Comparing Check-All and Forced-Choice Question Formats in Web Surveys. *Public Opin. Q.* 2006, 70, 66-77.

- [195] Adams, J., Williams, A., Lancaster, B., Foley, M., Advantages and uses of check all-that-apply response compared to traditional scaling of attributes for salty snacks. *7th Pangborn Sensory Science Symposium*, Minneapolis, MN, USA., 2007
- [196] Dooley, L., Lee, Y.-s., Meullenet, J.-F., The application of check-all-that-apply (CATA) consumer profiling to preference mapping of vanilla ice cream and its comparison to classical external preference mapping. *Food Qual. Pref.* 2010, *21*, 394-401.
- [197] Lado, J., Vicente, E., Manzoni, A., Ares, G., Application of a check-all-that-apply question for the evaluation of strawberry cultivars from a breeding program. *J. Sci. Food Agric.* 2010, *90*, 2268-2275.
- [198] Ares, G., Barreiro, C., Deliza, R., Giménez, A. N. A., Gámbaro, A., Application of a Check-All-That-Apply Question To The Development of Chocolate Milk Desserts. *J. Sens. Stud.* 2010, *25*, 67-86.
- [199] Ares, G., Varela, P., Rado, G., Giménez, A., Are consumer profiling techniques equivalent for some product categories? The case of orange-flavoured powdered drinks. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2011, *46*, 1600-1608.
- [200] Plaehn, D., CATA penalty/reward. *Food Qual. Pref.* 2012, *24*, 141-152.
- [201] Bruzzone, F., Ares, G., Giménez, A. N. A., Consumers' texture perception of milk desserts. II - Comparison with trained assessor's data.. *J. Texture Stud.* 2012, *43*, 214-226.
- [202] Schutz, H. G., Food Action Rating Scale for Measuring Food Acceptance. *J. Food Sci.* 1965, *30*, 365-374.
- [203] Meyners, M., Castura, J. C., Carr, B. T., Existing and new approaches for the analysis of CATA data. *Food Qual. Pref.* 2013, *30*, 309-319.
- [204] Garofalo, C., Osimani, A., Milanovic, V., Taccari, M., *et al.*, The microbiota of marketed processed edible insects as revealed by high-throughput sequencing. *Food Microbiol.* 2017, *62*, 15-22.

15. Anexos

Anexo 1. Modelo da ficha sensorial utilizada para avaliação das barras de cereais e frutos secos.

NomeNº da amostra:.....

Avalie a amostra apresentada em termos de aceitação, assinalando a pontuação desejada:

- Gosto extremamente 9
- Gosto muito..... 8
- Gosto moderadamente 7
- Gosto ligeiramente 6
- Não gosto nem desgosto 5
- Desgosto ligeiramente 4
- Desgosto moderadamente 3
- Desgosto muito 2
- Desgosto extremamente 1

Indique a situação que melhor descreve com que frequência comeria este produto se estivesse disponível no mercado:

- Comeria esta barra sempre que tivesse oportunidade 9
- Comeria esta barra muito regularmente 8
- Comeria esta barra regularmente 7
- Gosto desta barra e comeria ocasionalmente 6
- Comeria esta barra se estivesse disponível, mas não faria um grande esforço para a encontrar 5
- Não gosto desta barra, mas poderia comer pontualmente 4
- Difilmente alguma vez comeria esta barra 3
- Comeria esta barra se não houvesse mais nada para comer 2
- Só se fosse forçado(a) é que comeria esta barra 1

Da seguinte lista escolha os atributos que caracterizam a amostra apresentada ao nível da aparência, odor, textura e sabor:

Aparência

- Dourado Acastanhado Acinzentado

Odor

- A mofo A armário antigo A óleo de fritura A mel A amendoim
 A ranço A sabão Desagradável Muito desagradável Outros, especifique?

Textura

- Seca Granulosa Pulverulenta Fibrosa Mole
 Dura Húmida

Sabor

- Torrado Fim de boca desagradável Fim de boca muito longo Doce Mel
 Amendoim Ácido Sabão Térreo Agradável

Se identificou outros atributos relevantes por favor indique:

Anexo 2. Modelo da ficha sensorial utilizada para caracterização de produto ideal.

NomeNº da amostra:.....

Descreva o seu produto IDEAL:

Da seguinte lista escolha os atributos que caracterizam a sua amostra ideal de barras de cereais desta tipologia ao nível da aparência, odor, textura e sabor.

Aparência

- | | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Dourado | Acastanhado | Acinzentado |

Odor

- | | | | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| A mofo | A armário antigo | A óleo de fritura | A mel | A amendoim |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| A ranço | A sabão | Desagradável | Muito desagradável | Outros, especifique? |

Textura

- | | | | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Seca | Granulosa | Pulverulenta | Fibrosa | Mole |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | | |
| Dura | Húmida | | | |

Sabor

- Torrado Fim de boca desagradável Fim de boca muito longo Doce Mel
- Amendoim Ácido Sabão Térreo Agradável

Se considera importante outros atributos relevantes por favor indique:



Anexo 3. Modelo da ficha sensorial utilizada para avaliação dos produtos elaborados na Frulact.



Avaliação Sensorial

Nome: _____ Sexo: _____

1). Por favor, indique o quanto você gostou ou desgostou das características de cada uma das amostras utilizando a seguinte escala:

Escala:

- 1 - Desgostei extremamente (Detestei)
- 2 - Desgostei moderadamente
- 3 - Nem gostei/Nem desgostei
- 4 - Gostei moderadamente
- 5 - Gostei extremamente (Adorei)

Insira um número de 1 a 5 em cada caixa					
Código Amostra	Aparência	Cheiro	Sabor	Textura	Apreciação global

2) Doçura - Por favor, prove as amostras e, utilizando a escala, indique o quão ideal se encontra a doçura de cada uma delas.

Amostra	Nota
_____	()
_____	()
_____	()
_____	()

Escala:

- 1 – Extremamente menos doce que o ideal
- 2 – Moderadamente menos doce que o ideal
- 3 – Ideal
- 4 – Moderadamente mais doce que o ideal
- 5 – Extremamente mais doce que o ideal

3) Atitude de compra - Se este produto estivesse à venda, qual seria a sua atitude de compra para cada amostra?

Amostra	Nota
_____	()
_____	()
_____	()
_____	()

Escala:

- 1- Certamente não compraria
- 2- Provavelmente não compraria
- 3-Tenho dúvidas se compraria ou não
- 4- Provavelmente compraria
- 5- Certamente compraria

No caso de ter respondido que certamente/provavelmente não compraria indique qual a principal razão para rejeitar o produto: