

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIAS

ARIANA VIEIRA ALVES

**CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL DE LARVAS
DE *Pachymerus nucleorum* F. E *Tenebrio molitor*
L. ALIMENTADAS COM *Acrocomia aculeata*
(JACQ.) LODD**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AMBIENTAL**

DOURADOS/MS

MARÇO/2015

ARIANA VIEIRA ALVES

**CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL DE LARVAS
DE *Pachymerus nucleorum* F. E *Tenebrio molitor*
L. ALIMENTADAS COM *Acrocomia aculeata*
(JACQ.) LODD**

ORIENTADORA: Dr^a. ELIANA JANET SANJINEZ-ARGANDOÑA

COORIENTADOR: Dr^a. ADELITA MARIA LINZMEIER

**Dissertação de Mestrado submetida ao
Programa de Pós-graduação em Ciência e
Tecnologia Ambiental, como um dos
requisitos necessários para a obtenção do
Título de Mestre em Ciência e Tecnologia na
área de concentração Tecnologia Ambiental**

DOURADOS/MS



Termo de Aprovação

Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: “**Caracterização nutricional de larvas de *Pachymerus nucleorum* F. e *Tenebrio molitor* L.**”, de autoria de **Ariana Vieira Alves**, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.

Prof^a. Dr^a. Eliana Janet Sanjinez Argandoña
Presidente da banca examinadora

Prof^a. Dr^a. Cláudia Andréa Lima Cardoso
Membro Examinador (UFGD)

Prof. Dr. Manoel Araújo Uchoa-Fernandes
Membro Examinador (UFGD)

Dourados/MS, 20 de Março de 2015.

*“A beleza não está na partida nem
na chegada, mas na travessia.”*

(Guimarães Rosa)

*“Continue a nadar, continue a
nadar (...).”*

(Dory)

*Dedico este trabalho à minha
família, amo vocês!*



AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, a Profª Drª Eliana Janet Sanjinez-Argandoña, por acreditar que seria possível. Obrigada pela motivação, paciência, dedicação constante e por ser a pessoa que é, tanto na vida profissional quanto na pessoal. Que este seja o início de uma próspera parceria.

À Profª Drª Adelita Maria Linzmeier pela orientação, tornando possível este trabalho.

À Profª Drª Cláudia Andréa Lima Cardoso e ao Prof. Dr. Manoel Araújo Uchôa-Fernandes por ter sido um referencial profissional desde o primeiro ano de graduação. É um prazer tê-los na banca examinadora.

À Profª Drª Maria Lígia Rodrigues Macedo pelo apoio com as análises e prontidão em colaborar.

À Profª Drª Mônica Maria Bueno de Moraes e ao Prof. Dr. Valter Vieira Alves Júnior, meus pais, pelo amor incondicional e por não medirem esforços para que eu chegasse até aqui. Agradeço em especial à minha mãe, com quem partilhei o broto daquilo que veio a ser este trabalho, sem seu carinho e seu apoio nada disso seria possível.

A todos os funcionários e colegas do Laboratório de Tecnologia de Alimentos e do GEPPAC pelos maravilhosos momentos de companheirismo, trabalho e diversão.

À Camila e ao Fernando por terem me ensinado a dar os primeiros passos. À Priscilla, Débora, Andressa, Mari, Shara, Luan, Rogério, Dani Zuntini, Amanda “Bésti” e tantos outros que de alguma forma contribuíram para que este momento fosse possível, meu sincero agradecimento.

Agradeço em especial ao Vinícius e à Tânia, “bocós”, com os quais compartilhei as dificuldades e as glórias desses dois anos de mestrado. Obrigada pela parceria em coletas, análises, descontrações, brincadeiras, dramas e etc... E ao Skank pela distinta trilha sonora que embalou nosso dia-a-dia no laboratório.

À minha família e amigos, pela capacidade de acreditar e investir em mim. À minha avó Everly por estar sempre presente em todas as etapas de minha vida e ao meu irmão Vinícius.

Ao Jeferson, meu namorado pelo amor, paciência e incentivo. Sua presença significou segurança e certeza de que não estou sozinha nessa caminhada.

À FUNDECT pela bolsa concedida.

OBRIGADA!!

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2 AZINO BIS-3-ethylbenzo thiazoline 6 sulfonic acid diammoninum
AGM	Ácido graxo monoinsaturado
AGPI	Ácido graxo poli-insaturado
AGS	Ácido graxo saturado
CLA	Ácido linoleico conjugado
DDMS	Herbário da Cidade de Dourados –Mato Grosso do Sul
FCBA	Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais
HDL	High-density lipoprotein
LATEC	Laboratório de Tecnologia de Alimentos
LDL	Low-density lipoprotein
TROLOX	6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico
UFGD	Universidade Federal da Grande Dourados
UFPR	Universidade Federal do Paraná

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1. Composição nutricional de larvas de *Pachymerus nucleorum* (Coleoptera, Chrysomelidae, Bruchinae), da amêndoa de *Acrocomia aculeata* (Arecaceae) e de alimentos convencionais.....24

Tabela 2. Composição de ácidos graxos em lipídios totais do óleo extraído das larvas de *Pachymerus nucleorum* (Coleoptera, Chrysomelidae, Bruchinae) e da amêndoa de *Acrocomia aculeata* (Arecaceae).....26

Capítulo II

Tabela 1. Composição nutricional das larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera, Tenebrionidae) criadas em dietas artificiais A e B (fotoperíodo 10h L:14h E, T=25°C) e de alimentos convencionais.....43

Tabela 2. Composição de ácidos graxos do óleo de larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera, Tenebrionidae) criadas em dietas artificiais A e B (fotoperíodo 10h L: 14h E, T=25°C).....45

LISTA DE FIGURAS

Introdução

- Figura 1.** Larvas de *Tenebrio molitor*.....13
- Figura 2.** Larvas de *Pachymerus nucleorum*.14

Capítulo II

- Figura 1.** Composição nutricional de dietas (A, B, C e D) para criação de larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera, Tenebrionidae).....42

RESUMO

O consumo de insetos como alimento é praticado culturalmente em diversas regiões do mundo. No Brasil foram registradas mais de 130 espécies de insetos comestíveis, pertencentes a nove ordens, dentre as quais se destaca Coleoptera. Desta ordem, destacam-se *Tenebrio molitor* e *Pachymerus nucleorum*. A informação de que a amêndoa da bocaiuva é parasitada por larvas de *P. nucleorum* motivou a elaboração do primeiro manuscrito, despertando a hipótese de que essas larvas possam apresentar potencial nutricional igual ou superior ao de seus frutos. Os resultados obtidos do estudo mostraram que as proteínas representam a segunda maior porção da composição nutricional das larvas de *P. nucleorum* (33,13%), superior à amêndoa de bocaiuva (14,21%). Destacou-se também o elevado teor de lipídios nas larvas (37,87%), muito próximo ao da amêndoa (44,96%). Do óleo extraído das larvas, a fração correspondente aos ácidos graxos saturados foi de 40,17% e aos insaturados de 46,52%. A atividade antioxidante foi 24,3µM trolox/g de extrato do óleo. A atividade trípica das larvas foi $0,032 \pm 0,006$ nmol BAPNA/min. As larvas e a amêndoa de bocaiuva apresentaram ausência de fatores anti-nutricionais. Estes resultados favorecem o uso de larvas de *P. nucleorum* como alimento humano, sendo ótima fonte proteica e lipídica com concentrações consideráveis de ácidos graxos insaturados em relação à amêndoa de bocaiuva. Diante disso, decidiu-se elaborar dietas artificiais com adição de bocaiuva para criação de *T. molitor* visando determinar a composição química das larvas criadas em diferentes dietas, dando origem ao segundo manuscrito. As larvas de *T. molitor* foram analisadas quanto a sua composição nutricional, composição de ácidos graxos, atividade antioxidante, atividade trípica e fatores anti-nutricionais. Os resultados demonstraram que as larvas de *T. molitor* criadas em dieta artificial com adição de bocaiuva são ótima fonte proteica (44,83%) e lipídica (40,45%), em comparação com carnes consumidas por humanos e apresentam concentrações significativas de ácidos graxos insaturados (65,99%). A atividade antioxidante foi 4,5µM trolox/g do óleo das larvas. A atividade trípica das larvas foi $0,144 \pm 0,003$ nmol BAPNA/min. As larvas apresentaram ausência de fatores anti-nutricionais. A partir desses resultados concluiu-se que é possível criar larvas de *T. molitor* em dieta artificial com adição de farinha de bocaiuva, sem comprometer a qualidade nutricional do *T. molitor*, demonstrando que

larvas criadas em dietas artificiais podem ser um recurso alimentício altamente nutritivo.

Palavras-chave: Entomofagia, Coleoptera, Ácidos graxos, Alimento proteico, Bocaíuva.

ABSTRACT

The consumption of insects as food is culturally practiced in various regions of the world. In Brazil, there were more than 130 species of edible insects, belonging to nine orders, among which stands out Coleoptera. In this order, we highlight *Tenebrio molitor* and *Pachymerus nucleorum*. The information that the bocaiuva's kernel is parasitized by larvae of *P. nucleorum* motivated to develop the first manuscript, raising the hypothesis that these larvae can present nutritional potential equal to or higher than its fruits. The results of the study showed that the proteins are the second largest portion of the nutritional composition *P. nucleorum* larvae (33,13%), higher than the bocaiuva's kernel (14,21%). Also notable was the high fat larvae (37,87%), very close to the kernel (44,96%). The oil extracted from larvae, the corresponding fraction of the saturated fatty acids was 40,17% and 46,52% unsaturated. The antioxidant activity conducted by ABTS (2, 2'-3-azinobis ethylbenzothiazoline 6-sulfonic acid) method, found value of 24,3uM trolox/g oil. The tryptic activity of larvae was 0,032 + 0,006nmol BAPNA/min. The larvae and bocaiuva's kernel presented absence of anti-nutritional factors. These results favor the use of *P. nucleorum* larvae as food, with great protein and lipid source with considerable concentrations of unsaturated fatty acids in relation to the kernel of bocaiuva. Therefore, it was decided to develop artificial diets with added bocaiuva for feeding *T. molitor* to determine the chemical composition of larvae reared on different diets, leading to the second article. The *T. molitor* larvae were analyzed for their nutritional composition, fatty acid composition, antioxidant activity, trypsin activity and anti-nutritional factors. The results show that the *T. molitor* larvae reared on an artificial diet with bocaiuva are good protein source (44,83%) and lipid (40,45%), compared to conventional meats and show significant levels of unsaturated fatty acids (65,99%). Antioxidant activity was 4,5uM trolox/g oil. The tryptic activity of larvae was

0,144±0,003nmol BAPNA/min. The larvae showed no anti-nutritional factors. From these results it was concluded that it is possible to create *T. molitor* on artificial diet with added bocaiuva flour without compromising the nutritional quality of *T. molitor*, demonstrating that larvae reared on artificial diets can be a highly nutritious food resource.

Keywords: Entomophagy, Coleoptera, Fatty acids, Food protein, Bocaiuva.

SUMÁRIO

• Introdução	13
• Capítulo I	17
▪ Resumo	18
▪ Abstract	18
▪ Introdução	19
▪ Material e métodos	20
• Material	20
• Análises químicas	21
• Composição nutricional	21
• Composição de ácidos graxos	21
• Análise da atividade antioxidante	22
• Análise das atividades trípica e quimotríptica	22
• Análises estatísticas	23
▪ Resultados e discussão	23
• Composição nutricional	23
• Composição de ácidos graxos e atividade antioxidante	26
• Atividade trípica e fatores antinutricionais	27
• Conclusões	28
• Referências	29
• Capítulo II	33
▪ Resumo	34
▪ Abstract	34
▪ Introdução	35
▪ Material e métodos	38
• Material	38
• Nutrição das larvas	38
• Composição nutricional	38
• Composição de ácidos graxos	39
• Análise da atividade antioxidante	40
• Análise das atividades trípica e quimotríptica	40
• Análises estatísticas	41
▪ Resultados e discussão	41
• Composição nutricional das dietas	41
• Composição nutricional das larvas	43
• Composição de ácidos graxos e atividade antioxidante	45
• Atividade trípica e fatores antinutricionais	47
▪ Conclusões	47
▪ Referências	48
• Conclusão geral	53
• Anexo: normas para publicação	54

INTRODUÇÃO

Em 2013, após a Conferência Internacional sobre Florestas para Segurança Alimentar e Nutricional, a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) publicou um relatório [1] que incentiva o consumo de insetos como forma de combater a fome e promover a segurança alimentar.

Apesar de desafiador, a introdução de novos itens alimentares na dieta humana encontra precedente; ou seja, impressões negativas sobre certos tipos de alimentos podem ser reconsideradas. Consumidores descobriram que certos queijos com cheiro e sabor fortes podem ser muito gostosos, e que o consumo de animais vivos (ex.: ostras) e carne crua (ex.: sashimi, carpaccio) é hoje um fato comum [2].

Parece bastante ilógico que a ingestão de invertebrados artrópodes como lagostas e camarões (que se alimentam de material em decomposição) seja considerada normal na alimentação; enquanto o consumo de insetos (alguns exclusivamente herbívoros) seja visto com preconceito [3]. Assim, a informação de que os insetos apresentam alto valor nutricional permite quebrar barreiras do preconceito e possibilitar seu uso como fonte alimentícia.

Atualmente, um quarto das terras do mundo é usado para a criação de 1,7 bilhões de cabeças de gado, enquanto um terço das terras aráveis é usado para o plantio de grãos para alimentar os animais [4]. No Brasil, há registro de mais de 130 tipos de insetos comestíveis, divididos em nove ordens [5]. A segunda ordem em número de espécies consumidas por humanos é a Coleoptera [5]. Desta ordem, destacam-se *Tenebrio molitor* Linnaeus, 1758 (Tenebrionidae) (Fig. 1) e *Pachymerus nucleorum* Fabricius, 1792 (Chrysomelidae, Bruchinae) (Fig. 2).



Figura 1. Larvas de *Tenebrio molitor* (Tenebrionidae) criadas em dietas artificiais com adição de bocaiuva. Fonte: Arquivo pessoal.



Figura 2. Larvas de *Pachymerus nucleorum* (Chrysomelidae, Bruchinae) obtidas do coquinho de bocaiuva. Fonte: Arquivo pessoal.

Tenebrio molitor, representante típico da família Tenebrionidae, é um dos maiores besouros que infestam armazéns de produtos alimentícios, principalmente de grãos [6]. *Pachymerus nucleorum*, pertencente à família Chrysomelidae, é comum em cocos de palmeiras, especialmente da bocaiuva (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart., 1845); sua larva se desenvolve dentro do coco se alimentando exclusivamente da amêndoa [5].

Na região do Cerrado brasileiro a bocaiuva, conhecida também por macaúba, é abundante e fornece frutos com valor nutricional elevado [7,8,9] por possuir alto teor de ácidos graxos e de carotenoides. O óleo da polpa da bocaiuva apresenta predominância de ácidos graxos monoinsaturados, em especial do ácido oleico. A informação de que a amêndoa da bocaiuva é parasitada por larvas de *P. nucleorum* motivou o presente trabalho, despertando a hipótese de que essas larvas possam apresentar potencial nutricional igual ou superior ao de seus frutos.

Foi realizada a coleta e a composição nutricional das larvas de *P. nucleorum* e da amêndoa da bocaiuva, comparando-as entre si para avaliar a qualidade nutricional. Os teores elevados de lipídios e de proteínas encontrados nas larvas de *P. nucleorum* chamaram a atenção e motivaram a realização da composição de ácidos graxos e avaliação da atividade trípica e de fatores anti-nutricionais.

Estudos mostram que além da coleta existe a possibilidade de criação massiva em cativeiro de insetos comestíveis que pode ser um meio de produção alimentar com menor impacto ambiental do que as formas atualmente em uso [4,10,11]. A partir dessa informação foi desenvolvido uma pesquisa com larvas de *T. molitor* por ser uma espécie

de simples manejo, que apresenta fácil manipulação e reprodução e requer pequenos espaços [12].

Acredita-se que dietas alternativas com farinha de bocaiuva possam favorecer ao aumento da concentração de ácidos graxos insaturados nas larvas de *T. molitor*. Assim, comparação do valor nutritivo das larvas alimentadas com diferentes dietas permitirá indicar novas fontes de biomassa que aumentem o valor nutricional do tenébrio. Do exposto, esta dissertação está apresentada em dois capítulos, estruturados na forma de artigos científicos.

No primeiro manuscrito é apresentada a composição nutricional, a composição de ácidos graxos, a atividade antioxidante, a atividade trípica e investigou-se a presença fatores anti-nutricionais das larvas de *P. nucleorum* e da amêndoa da bocaiuva.

O segundo manuscrito aborda a composição centesimal das dietas artificiais com adição de farinha de polpa bocaiuva e das larvas de *T. molitor*. Das larvas, ainda foi realizada a composição nutricional e de ácidos graxos, a atividade antioxidante, a atividade trípica e verificou-se a presença fatores anti-nutricionais.

Acredita-se que o conhecimento gerado por esses dois trabalhos contribuam para a definição de condições que permitam, futuramente, a obtenção de produtos alimentícios direcionados a esportistas ou pessoas de necessitem que consumo suplementar de proteínas. Além de ser um nicho em potencial para o combate à fome e à desnutrição das populações. Os estudos do aproveitamento de insetos obtidos da amêndoa da bocaiuva e da criação em cativeiro com dietas adicionando-se de farinha de polpa de bocaiuva contribuem para a preservação dessa espécie de palmeira nativa do Cerrado.

Referências

1. FAO. Forest insects as food: Humans bite back. FAO of the United Nations Regional Office for Asia and the Pacific, Bangkok, 2010.
2. Johnson DV. The contribution of edible forest insects to human nutrition and forest management. In: Forest Insects as Food: Humans Bite Back, FAO of the United Nations Regional Office for Asia and the Pacific, Bangkok; 2010. pp. 5-22.
3. Costa-Neto EM. Manual de Entomologia/MT SEA. Manuales e Tesis, Sociedade Entomológica Aragonesa. Zaragoza; 2002.

4. Worldwatch Institute. Estado do Mundo 2010: Transformando Culturas do Consumismo à Sustentabilidade. Washington: UMA Editora; 2010. Disponível: http://www.akatu.org.br/akatu_acao/publicacoes/reflexoes-sobre-o-consumo-consciente. Acessado: 17/09/2014.
5. Costa-Neto EM, Ramos-Elorduy J. Los Insectos Comestibles de Brasil: Etnicidad, Diversidad e Importancia em la Alimentación. *Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa*. 2006: 423-442.
6. Bednářová M, Borkovcová M, Mlček J, Rop O, Zeman L. Edible Insects – Species Suitable For Entomophagy Under Condition Of Czech Republic. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*. 2013; 16.
7. Ramos MIL, Ramos-Filho MM, Hiane PA, Braga-Neto JÁ, Siqueira EMA. Qualidade nutricional da polpa da bocaiúva *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2008; 28: 90-94.
8. Dessimoni-Pinto NAV, Silva VM, Batista AG, Vieira G, Souza CR, Dumont PV et al. Características físico-químicas da amêndoa de macaúba e seu aproveitamento na elaboração de barras de cereais. *Alimentos e Nutrição*. 2010; 21: 79-86.
9. Chuba CAM, Sanjinez-Argandoña EJ. Caracterização Biométrica, Física E Química De Frutos Da Palmeira Bocaiuva *Acrocomia aculeata* (Jacq) Lodd. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 2011; 33: 1023-1028.
10. Durst, PB, Shono K. Edible forest insects: Exploring new horizons and tradicional practices. In: *Forest Insects as Food: Humans Bite Back*, FAO of the United Nations Regional Office for Asia and the Pacific, Bangkok; 2010. pp. 1-4.
11. Van Huis A. Potential of Insects as Food and Feed in Assuring Food Securit. *Annual Review of Entomology*. 2013; 58: 563-583.
12. Aguilar-Miranda ED, Lopez MG, Escamilla-Santana C, De La Rosa BAP. Characteristics of maize flour tortilla supplemented with ground *Tenebrio molitor* Larvae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002; 50: 192-195.

Capítulo I

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL ALIMENTÍCIO
DAS LARVAS DE *Pachymerus nucleorum* (COLEOPTERA,
CHRYSOMELIDAE, BRUCHINAE) F. QUE PARASITAM A
AMÊNDOA DE *Acrocomia aculeata* (JACQ.) LODD. EX
MART. (ARECACEAE)

O artigo foi elaborado de acordo com as normas da revista Plos One, a qual será submetido.

1 **Resumo**

2 O consumo de insetos como alimento é praticado culturalmente em diversas
3 regiões do mundo. No Brasil foram registradas mais de 130 espécies de insetos
4 comestíveis, pertencentes a nove ordens, dentre as quais se destaca Coleoptera. A larva
5 do coleóptero *Pachymerus nucleorum* Fabricius, 1792 se desenvolve dentro do fruto de
6 bocaiuva (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart., 1845), que possui qualidade
7 nutricional comprovada. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial nutricional das
8 larvas de *P. nucleorum* em comparação com a amêndoa de bocaiuva para alimentação
9 humana. As proteínas representam a segunda maior porção da composição nutricional
10 das larvas (33,13%), superior à amêndoa de bocaiuva (14,21%). Destacou-se também o
11 elevado teor de lipídios das larvas (37,87%), muito próximo ao da amêndoa (44,96%).
12 Do óleo extraído das larvas, a fração correspondente aos ácidos graxos saturados é de
13 40,17% e aos insaturados de 46,52%. A atividade antioxidante constatou valor de 24,3
14 μM trolox/g óleo extraído das larvas. A atividade trípica das larvas foi $0,032 \pm 0,006$
15 nmol BAPNA/min, tanto as larvas como a amêndoa de bocaiuva apresentaram ausência
16 de fatores anti-nutricionais. Estes resultados favorecem o uso de larvas de *P. nucleorum*
17 como alimento humano, sendo ótima fonte proteica e lipídica com concentrações
18 consideráveis de ácidos graxos insaturados em relação à amêndoa de bocaiuva.

19
20 **Palavras-chave:** Entomofagia, Coleoptera, Ácidos graxos, Alimento proteico,
21 Bocaiuva.

24 **Abstract**

25 The consumption of insects as food is culturally practiced in various regions of
26 the world. In Brazil, there were more than 130 species of edible insects, belonging to
27 nine orders, among which stands out Coleoptera. The larva of the coleopter *Pachymerus*
28 *nucleorum* Fabricius, 1792 develops into the fruit of bocaiuva (*Acrocomia aculeata*
29 (Jacq.) Lodd. ex Mart., 1845), which has proven nutritional quality. The aim of this
30 study was to evaluate the nutritional potential of the larvae of *P. nucleorum* compared
31 with bocaiuva's kernel for human consumption. Proteins are the second largest portion
32 of the nutritional composition of the larvae (33,13%), higher than the almond bocaiuva

33 (14,21%). Also notable was the high larval lipid content (37,87%), very close to the
34 kernel (44,96%). From oil extracted from larvae, the corresponding fraction of the
35 saturated fatty acids is 40,17% and 46,52% unsaturated. The antioxidant activity was
36 24,3µM trolox/g oil extracted from larvae. The tryptic activity of larvae was 0,032 +
37 0.006nmol BAPNA/min, both the larvae as almond bocaiuva presented absence of anti-
38 nutritional factors. These results favor the use of *P. nucleorum* larvae as food, with great
39 protein and lipid source with considerable concentrations of unsaturated fatty acids in
40 relation to the kernel of bocaiuva.

41

42 **Keywords:** Entomophagy, Coleoptera, Fatty acids, Food protein, Bocaiuva.

43

44

45 **Introdução**

46 A Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO)
47 estima que no período de 2010 a 2012 aproximadamente 870 milhões de pessoas
48 estavam subnutridas, isso indica que 12,5% da população mundial equivalente a um em
49 cada oito seres-humanos são afetados pela desnutrição [1].

50 Apesar do aumento substancial na produção de alimentos nos últimos cinquenta
51 anos [2], estima-se um aumento populacional para nove bilhões de pessoas até 2050, o
52 que acarretará menor disponibilidade de alimentos, especialmente de proteína animal
53 [3,4]. Em 2013, após a Conferência Internacional sobre Florestas para Segurança
54 Alimentar e Nutricional, a FAO publicou um relatório [5] que incentiva o consumo de
55 insetos como forma de combater a fome e promover a segurança alimentar, pois os
56 insetos são fonte de proteínas.

57 O consumo de insetos como alimento é praticado culturalmente em diversas
58 regiões do mundo, exceto em regiões desenvolvidas como Europa e América do Norte.
59 Jongema [6] aponta um valor estimado de 2000 espécies de insetos comestíveis,
60 consumidas por mais de 3000 grupos étnicos [7].

61 O Brasil possui uma biosociodiversidade extremamente rica e exuberante,
62 apresentando uma das maiores diversidades biológicas do planeta e enorme diversidade
63 cultural. Costa Neto e Ramos-Elorduy et al. [8] registraram para o Brasil 135 espécies
64 de insetos comestíveis, pertencentes a 9 ordens, dentre as quais destaca-se Coleoptera,
65 com 22 espécies reportadas como alimento humano. *Pachymerus nucleorum* Fabricius,

66 1792 (Chrysomelidae, Bruchinae) é um besouro comum em cocos de palmeiras de
67 babaçu (*Attalea speciosa* Mart. ex Spreng.), de piaçava (*Attalea funifera* Mart. ex
68 Speg.), de licuri (*Syagrus coronata* (Mart.)Becc.) e de bocaiuva (*Acrocomia aculeata*
69 (Jacq.) Lodd. ex Mart., 1845), cuja larva se desenvolve dentro do coco se alimentando
70 exclusivamente da amêndoa [8].

71 Entre as palmeiras encontradas no Estado do Mato Grosso do Sul, destaca-se a
72 bocaiuva. Estudos demonstram que seu fruto (polpa e amêndoa) é rico em carotenoides
73 e ácidos graxos apresentando alta capacidade nutricional [9,10,11] e anti-inflamatória
74 [12,13].

75 Os ácidos graxos são classificados em saturados e insaturados; os insaturados
76 desempenham importantes funções no organismo humano como, por exemplo, atuam na
77 manutenção do sistema imunológico em processos inflamatórios. Os valores de ácidos
78 graxos encontrados no óleo de bocaiuva sugerem ação efetiva nessas patologias [13].

79 Do exposto, objetivou-se avaliar o potencial nutricional das larvas de *P.*
80 *nucleorum* em comparação com a amêndoa da bocaiuva, esperando-se que o inseto
81 possua características nutricionais iguais ou superiores às da amêndoa.

82

83

84 **Material e métodos**

85 **Material**

86 Frutos de bocaiuva, *Acrocomia aculeata* (Arecaceae) (depositada no Herbário
87 DDMS da Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD sob número nº 4783,
88 PEREIRA, Z.V.), infestados por *Pachymerus nucleorum* foram coletadas na região de
89 Dourados-MS, Brasil. Os frutos foram transportados ao laboratório e quebrados para a
90 retirada das amêndoas e das larvas de seu interior. Após serem retiradas, as amêndoas
91 foram secas em estufa com circulação de ar a 40°C por 72h, trituradas e armazenadas
92 em ambiente fresco. As larvas foram lavadas, acondicionadas em caixas de poliestireno
93 expandido e congeladas a -6°C, mantendo-se armazenadas nessa temperatura até
94 realização das análises. A identificação de *Pachymerus nucleorum* foi realizada pela
95 Dr^a. Cibele Stramare Ribeiro-Costa da Universidade Federal do Paraná (UFPR),
96 especialista brasileira no grupo.

97

98

99 **Análises químicas**

100 Foram realizadas as análises de composição nutricional, composição de ácidos
101 graxos, atividade antioxidante, atividade trípica e fatores anti-nutricionais das
102 amêndoas de bocaiuva e das larvas de *Pachymerus nucleorum*.

103

104 **Composição nutricional**

105 Foram determinados: teor de umidade em estufa [14]; resíduo mineral fixo pela
106 queima do material em mufla a 550°C [14]; lipídios por extração com éter de petróleo
107 em equipamento de Soxhlet [14]; o teor de proteínas foi quantificado pela determinação
108 do nitrogênio presente na amostra realizada pelo método Kjeldahl utilizando o fator de
109 conversão 6,25 [14]; fibras por extração ácida e alcalina [15].

110 A determinação de carboidratos foi feita por diferença (100g de amostra – g de
111 umidade-minerais-lipídios-proteínas-fibras). O valor energético foi calculado através
112 dos coeficientes de *Atwater* que consideram 4 kcal/g de amostra para proteínas e
113 carboidratos e 9 kcal/g de amostra para lipídios [16].

114

115 **Composição de ácidos graxos**

116 Foram extraídos os lipídios das amêndoas e das larvas, de acordo com o método
117 de Bligh e Dyer [17]. Para a transesterificação dos triglicerídeos, aproximadamente
118 50mg da matéria lipídica extraída foram transferidos para tubos falcon de 15mL, aos
119 quais foram adicionados 2mL de n-heptano. A mistura foi agitada até a completa
120 dissolução da matéria graxa e foram adicionados 2mL de KOH 2 mol/L em metanol. A
121 mistura foi agitada por aproximadamente 5min e após a separação das fases, 1mL da
122 fase superior (heptano e ésteres metílicos de ácidos graxos) foi transferido para frascos
123 eppendorf de 1,5mL. Os frascos foram hermeticamente fechados, protegidos da luz e
124 armazenados em freezer a -18°C, para posterior análise cromatográfica.

125 A composição de ácidos graxos foi determinada por cromatografia gasosa,
126 utilizando-se cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama (GCHA-
127 Shimadzu). Para a eluição foi empregada uma coluna capilar de sílica fundida de 100m
128 x 0,25mm x 0,20µm (SP-2560). A temperatura do forno foi programada para iniciar em
129 100°C e foi mantida assim por 1min, quando foi elevada a 170°C a 6,5°C/min.

130 Posteriormente, outra elevação de 170 a 215°C foi realizada a 2,75°C/min. e a
131 temperatura foi mantida por 12min. Finalmente, uma última elevação foi realizada de
132 215 para 230°C a 40°C/min. As temperaturas do injetor e detector foram de 270 e
133 280°C, respectivamente.

134 As amostras de 0,5µL foram injetadas em modo “split” (1:20), utilizando-se
135 nitrogênio como gás carreador a uma velocidade de arraste de 1ml/min. A identificação
136 dos ésteres metílicos de ácidos graxos foi realizada por comparação com os tempos de
137 retenção dos compostos da amostra com os padrões (Sigma) eluídos nas mesmas
138 condições das amostras.

139

140 **Análise da atividade antioxidante**

141 O extrato foi preparado a partir da mistura de 1g de óleo e 50mL de solução
142 hidrometanólica (50%). Após repouso de 60min., o material foi centrifugado (4000rpm)
143 por 15min e o sobrenadante retirado. Ao sedimento foi adicionada 40mL de acetona
144 (70%) para realizar a segunda extração seguindo-se o procedimento da 1ª extração. Os
145 sobrenadantes das duas extrações foram misturados, transferidos para um balão
146 (100mL) e o volume completado com água destilada, obtendo-se o extrato.

147 O radical ABTS^{•+} (2, 2 AZINO BIS-3-ethylbenzo thiazoline 6 sulfonic acid
148 diammonium) foi formado pela reação de ABTS^{•+} (7mM) com persulfato de potássio
149 (140 mM), a mistura reagiu por 16h à temperatura ambiente e na ausência de luz,
150 obtendo-se a solução radicalar. Para as análises, a solução radicalar foi diluída em
151 etanol até absorvância de 0,70 (± 0,05) a 734nm (espectrofotômetro Biospectro).
152 Alíquotas de 30 µL de amostra foram adicionadas a 3mL da solução diluída de ABTS^{•+}
153 e as absorvâncias da mistura foram registradas após 6min. A atividade antioxidante foi
154 calculada utilizando-se da curva-padrão de 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido
155 carboxílico (Trolox). A curva-padrão foi preparada a partir de soluções etanólicas de
156 Trolox nas concentrações de 100; 500; 1000; 1500 e 2000 µM [18]. Os resultados foram
157 expressos em µM de Trolox/g de extrato. Cada determinação foi realizada em triplicata.

158

159 **Análise das atividades tríptica e quimotríptica**

160 As atividades tríptica e quimotríptica foram realizadas em microplacas [19]. O
161 ensaio utiliza a hidrólise de substratos cromogênicos N-α Benzoyl-D-L-Arginine p-

162 Nitroanilide (BApNA) para tripsina e Succinil Alanina Alanina PF p-Nitroanilide
163 (SAAPFPNA) para quimotripsina.

164 A atividade trípica larval foi feita incubando as amostras com Tris-HCl 50mM,
165 pH 8,0 para um volume final de 70µL. Após adição do substrato, o tempo de ensaio foi
166 de 30 min a 37°C. O resultado desta análise foi expresso em nmol/BApNA/min. e
167 UI/mL. A atividade quimotríptica larval foi analisada incubando as amostras com Tris-
168 HCl 50mM, pH 8,0 para um volume final de 100µL. Após adição do substrato o tempo
169 de ensaio foi de 10min a 37°C e a reação lida em Leitor de Microplacas Multiskan Go a
170 410nm. O resultado desta análise foi expresso em nmol/ SAAPFPNA/min. e UI/mL.

171 Nos ensaios enzimáticos para análise do potencial anti-trípico e anti-
172 quimotríptico das larvas foi adicionado 10µL de tripsina bovina, no anti-trípico, e 10µL
173 de quimotripsina bovina, no anti-quimotríptico, para que seja determinado se possuem
174 ação inibitória sobre esta enzima. Após adição do Tris-HCl 50mM, pH 8,0 foram
175 adicionados os respectivos substratos como descrito nos ensaios trípico e quimotríptico
176 das larvas, prosseguindo a incubação e leitura no a 410nm. Para cada ensaio e amostra
177 foram feitas três replicatas. As reações foram lidas em Leitor de Microplacas Multiskan
178 Go a 410nm.

179

180 **Análises estatísticas**

181 Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos
182 como média e desvio padrão. As comparações dos valores médios entre os grupos
183 foram realizadas pela análise de variância (ANOVA) e as diferenças comparadas pelo
184 teste de Tukey ao nível de significância de $p < 0,05$ com auxílio do programa Statistica
185 versão 8.0 [20] e Prism 3.0 [21].

186

187

188 **Resultados e Discussão**

189 **Composição nutricional**

190 Os resultados da composição nutricional das larvas de *P. nucleorum* e da
191 amêndoa da bocaiuva foram comparados com os valores da composição nutricional da
192 carne bovina e da soja (Tabela 1), estabelecidos pela Tabela Brasileira de Composição
193 de Alimentos [22].

194 **Tabela 1. Composição nutricional de larvas de *Pachymerus nucleorum* (Coleoptera,**
 195 **Chrysomelidae), da amêndoa de *Acrocomia aculeata* (Arecaceae) e de alimentos**
 196 **convencionais.**

Constituintes	<i>Pachymerus nucleorum</i>	Amêndoa	Carne bovina**	Soja**
Umidade* (g/100g)	35,15±0,64 ^a	5,13±0,2 ^b	52,70	5,80
Umidade (g/100g)	54,22 ^a	5,54 ^b	-	-
Minerais (g/100g)	3,15±0,24 ^a	2,23± 0,10 ^a	1,90	5,00
Lipídios (g/100g)	37,87±0,97 ^a	44,96±0,79 ^b	67,23	14,60
Proteínas (g/100g)	33,13±0,98 ^a	14,21±0,85 ^b	35,31	36,00
Carboidratos	Fibras (g/100g)	15,37±1,24 ^a	N.A.	-
	Amido (g/100g)	-	-	38,40
Valor energético (kcal/100g)	473	461	358	404

197 Valores apresentado em base seca. Os resultados estão expressos com ± desvio padrão, n=3. *Umidade
 198 em base úmida. **TACO - Tabela brasileira de composição de alimentos, 2011. N.A. = não aplicável.
 199 Médias com sobrescrito diferente na mesma linha diferem significativamente (p< 0,05).

200

201 As larvas de *P. nucleorum* apresentaram 35,15% de umidade (Tabela 1), valor
 202 inferior ao da carne bovina (52,7%). Tanto as amêndoas de bociuiva quanto a soja
 203 apresentaram teores de umidade semelhantes (5,13% e 5,80% respectivamente). Os
 204 demais constituintes apresentados foram calculados em base seca para evitar a
 205 interferência do teor de umidade nas amostras.

206 O conteúdo de minerais nas larvas (3,15%) foi próximo ao encontrado na
 207 amêndoa de bociuiva (2,23%) e superior ao da carne bovina (1,9%) (Tabela 1). O valor
 208 encontrado de resíduo mineral fixo atende a recomendação de ingestão diária de
 209 minerais, que é de aproximadamente 3g [23]. Ou seja, 30g de larvas de *P. nucleorum*
 210 atende 31% da necessidade diária de minerais em humanos.

211 O elevado teor de lipídios das larvas (37,87%), inferior ao da amêndoa (44,96%)
 212 e superior ao da soja (14,60%) (Tabela 1). Do ponto de vista energético, os lipídios são
 213 importantes porque produzem 9kcal por grama de alimento quando oxidados no
 214 organismo [23]. Em alguns países esta fonte energética contribui com 30-40% do total
 215 de energia consumida na alimentação humana [23]. Os lipídios são componentes
 216 estruturais de todos os tecidos e são indispensáveis na estruturação das membranas e
 217 organelas celulares [24,25,26]. Os lipídios também estimulam a absorção dos

218 carotenoides pelo organismo, proporcionando a biodisponibilidade destes compostos
219 [27].

220 A digestibilidade das proteínas de insetos é comparável com as de carnes
221 convencionais [28]. As proteínas representam a segunda maior porção da composição
222 nutricional das larvas de *P. nucleorum* (Tabela 1). O teor de proteína das larvas
223 (33,13%) foi semelhante ao valor reportado por Ramos-Elorduy et al. [29] para a
224 mesma espécie (33,05%). Este valor é superior ao da amêndoa da bocaiuva que
225 apresentou apenas 14,21% de proteínas, próximo ao da carne bovina (35,31%) e ao da
226 soja (36,0%), como pode ser observado na Tabela 1. Estes resultados demonstram o
227 potencial de uso das larvas de *P. nucleorum* como suplemento proteico para atletas e
228 pessoas interessadas em aumentar o consumo de proteínas.

229 A proteína animal é superior a vegetal, portanto os melhores suplementos
230 proteicos devem incluir alguma proteína animal [30]. Muitos desses produtos contêm
231 proteína derivada do leite, cuja produção causa um impacto ambiental muito maior do
232 que dos insetos [30]. Esse tipo de produto produzido à base de insetos enfrenta uma
233 barreira de aceitabilidade relativamente baixa, pois visam consumidores com
234 consciência nutricional e ambiental, e a origem da proteína não é visivelmente ou
235 palatalmente distinguível (ex.: a substituição da soja em pó por inseto em pó não altera
236 a aparência, sabor ou textura do produto) [30]. Ou seja, o uso de insetos na indústria
237 alimentícia pode constituir um ingrediente de alta qualidade proteica para um
238 suplemento proteico de elevado padrão.

239 A Portaria nº 27/1998 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária [31]
240 estabelece que para um alimento ser considerado rico em fibras ele deve apresentar mais
241 de 6% de teor de fibras. As larvas de *P. nucleorum* e as amêndoas de bocaiuva estão
242 inseridas nesta categoria, pois apresentaram respectivamente 15,37% e 39,17% de
243 fibras. O consumo de alimentos ricos em fibras está associado à redução do risco de
244 doenças cardiovasculares, redução dos níveis glicêmicos e lipídicos associados à
245 diminuição de hiperinsulinemia. Além disso, o alto consumo acarreta menores riscos
246 para o desenvolvimento da obesidade [32].

247 Quanto ao valor energético, a larva de *P. nucleorum* sobressaiu-se (473kcal) em
248 relação à amêndoa (461kcal), à carne bovina (358kcal) e à soja (404kcal), por possuir
249 valor mais elevado (Tabela 1). Para comunidades menos favorecidas, 100g de larva

250 representaria aproximadamente um terço do valor energético diário a ser consumido
251 [23].

252

253 **Composição de ácidos graxos e atividade antioxidante**

254 Quantitativamente, o principal ácido graxo encontrado no óleo extraído das
255 larvas de *P. nucleorum* foi o ácido oleico (44,09%), seguido do ácido láurico (33,87%),
256 do esteárico (3,91%) e do linoleico (3,96%) (Tabela 2). O óleo extraído da amêndoa
257 apresentou em sua fração lipídica, como seus principais ácidos graxos, o láurico
258 (39,56%), o oleico (33,04%), o mirístico (7,99%) e o palmítico (6,87%), além de 3,03%
259 de ácido linoleico.

260

261 **Tabela 2. Composição de ácidos graxos em lipídios totais do óleo extraído das**
262 **larvas de *Pachymerus nucleorum* (Coleoptera, Chrysomelidae) e da amêndoa de**
263 ***Acrocomia aculeata* (Arecaceae).**

Ácidos graxos (%)	<i>P. nucleorum</i>	Amêndoa
Ácido Caprício (C6:0)	-	0,33±0,01
Ácido Caprílico (C8:0)	-	2,89±0,03
Ácido Láurico (C12:0)	33,87±0,5 ^a	39,56±0,07 ^b
Ácido Mirístico (C14:0)	2,45±0,01 ^a	7,99±0,05 ^b
Ácido Palmítico (C16:0)	2,01±0,01 ^a	6,87±0,04 ^b
Ácido Esteárico (C18:0)	3,91±0,01 ^a	3,14±0,02 ^a
Ácido Araquídico (C20:0)	0,02±0,01 ^a	0,11±0,01 ^a
Ácido Palmitoleico (C16:1)	0,05±0,01 ^a	0,08±0,01 ^a
Ácido Oleico (C18:1)	44,09±0,10 ^a	33,04±0,08 ^b
Ácido Linoleico (C18:2)	3,96±0,01 ^a	3,03±0,01 ^a
Ácido α -Linolênico (C18:3)	0,04±0,01 ^a	0,09±0,01 ^a
Ácido Eicosapentaenóico-CLA (C20:5)	0,07±0,01	-
Σ AGS ^A	42,26	60,89
Σ AGM ^B	44,95	33,12
Σ AGPI ^C	4,0	3,12

264 ^AAGS-ácidos graxos saturados. ^BAGM- ácidos graxos monoinsaturados. ^CAGPI- ácidos graxos poli-
265 insaturados. Os resultados estão expressos com \pm desvio padrão, n=3. Média com sobrescrito diferente na
266 mesma linha diferem significativamente (p < 0,05).

267

268 Do óleo extraído das larvas, a fração correspondente aos ácidos graxos saturados
269 é de 42,26% e aos insaturados é de 48,95% (Tabela 2). O óleo da amêndoa apresentou
270 60,89% de ácidos graxos saturados e 36,24% de insaturados. Os resultados confirmam o
271 alto teor de ácidos graxos insaturados nos óleos da larva e da amêndoa, em razão,
272 principalmente, do alto conteúdo de ácido oleico.

273 Os ácidos graxos poli-insaturados das séries ômega-3 (C18:3 e C20:5) e ômega-
274 6 (C18:2) apresentam principais efeitos na prevenção de doenças cardiovasculares e
275 câncer [24]. A alta concentração de ácidos graxos no óleo afeta sua atividade
276 antioxidante, que é altamente desejada na dieta humana [24].

277 O ácido linoleico conjugado (CLA) está presente nos produtos de carne e tem
278 demonstrado ter atividade antioxidante [33,34]. O CLA pode diminuir o acúmulo de
279 ácidos graxos saturados nas membranas celulares, tornando essas membranas menos
280 susceptíveis à oxidação e, desta forma, possuem menor potencial de causar danos
281 oxidativos aos componentes celulares [33,34].

282 A atividade antioxidante do óleo das larvas de *P. nucleorum*, avaliada através do
283 método ABTS, foi de 24,3 µM trolox/g, muito superior à de óleos convencionais como
284 o de soja (2,2 µM trolox/g) e o de girassol (1,17 µM trolox/g) [35].

285 Há evidências de que a alta concentração de ácidos graxos monoinsaturados
286 (AGM) é benéfica ao organismo. A substituição de carboidratos por AGM aumenta a
287 concentração de colesterol HDL e a substituição de ácidos graxos saturados por AGM
288 diminui o nível de colesterol LDL no sangue [24,36,37].

289

290 **Atividade trípica e fatores anti-nutricionais**

291 A digestão de proteínas começa no estômago, onde se decompõem em proteases,
292 peptonas e polipeptídeos grandes, e continua no intestino onde sofrem a maior parte da
293 digestão na porção intestinal correspondente ao duodeno. Nesta porção as proteínas
294 sofrem ação das enzimas secretadas pelo pâncreas, principalmente das enzimas
295 proteolíticas tripsina, quimiotripsina e carboxipoli-peptidase [38]. Dentre as enzimas
296 proteolíticas, destaca-se a tripsina por ser encontrada em sistemas digestivos de muitos
297 vertebrados que necessitam hidrolisar e absorver proteínas. Ou seja, a atividade da
298 tripsina é fundamental no processo de hidrólise e na absorção de proteínas, pois essas
299 moléculas são grandes para serem absorvidas pelo intestino [38].

300 As larvas de *P. nucleorum* e as amêndoas de bocaiuva foram submetidas à
301 análise de atividade trípica, antitripica, quimotripica e anti-quimotripica. A atividade
302 da enzima tripsina das larvas foi $0,032 \pm 0,006$ nmol BAPNA/min., não foi identificada
303 atividade da tripsina na amostra da amêndoa. A presença dessa enzima sugere que o
304 consumo dessas larvas como alimento pode gerar maior disponibilidade de
305 aminoácidos.

306 Fortalecendo essa hipótese, constatou-se a ausência de fatores anti-nutricionais
307 nas larvas e também nas amêndoas, avaliadas pelas análises anti-trípica e anti-
308 quimotripica. A presença desses fatores pode prejudicar a absorção e o aproveitamento
309 das proteínas provenientes da dieta, pois o inibidor de tripsina liga-se à enzima tripsina,
310 responsável pela digestão de proteínas [39].

311

312

313 **Conclusões**

314 Os resultados indicaram que as larvas de *Pachymerus nucleorum* são ótimas
315 fontes proteica e lipídica para humanos com concentrações significativas de ácidos
316 graxos insaturados em relação à amêndoa de bocaiuva.

317 As larvas e as amêndoas de bocaiuva apresentaram ausência de fatores anti-
318 nutricionais favorecendo seu uso na alimentação humana.

319 A exploração racional do *Pachymerus nucleorum* como alimento humano pode
320 ser aproveitada pela indústria alimentícia para produção de suplementos proteicos para
321 atletas e pessoas que desejam elevar o consumo proteico; e ainda, servir de incentivo
322 para a conservação das espécies de insetos utilizadas, de suas plantas hospedeiras e de
323 seus habitats naturais.

324

325

326 **Agradecimentos**

327 À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia
328 do Estado de Mato Grosso do Sul - FUNDECT pelo apoio financeiro. À Dr^a. Cibele
329 Stramare Ribeiro-Costa pela identificação taxonômica do *P. nucleorum*.

330

331

332

333 Referências

- 334 1. FAO, WFP, IFAD. The State of Food Insecurity in the World, 2012. Economic
335 growth is necessary but not sufficient to accelerate reduction of hunger and
336 malnutrition. Rome: FAO; 2012.
- 337 2. Luan Y, Cui X, Ferrat M. Historical trends of food selfsufficiency in Africa. Food
338 Security.2013; 5: 393–405.
- 339 3. Mitsuhashi J. The future use of insects as human food. In: Forest Insects as Food:
340 Humans Bite Back, FAO of the United Nations Regional Office for Asia and the
341 Pacific, Bangkok; 2010. pp. 115-122.
- 342 4. Ingram J. A food systems approach to researching food security and its interactions
343 with global environ- mental change. Food Security. 2011; 3: 417-431.
- 344 5. FAO. Forest insects as food: Humans bite back. FAO of the United Nations Regional
345 Office for Asia and the Pacific, Bangkok, 2010.
- 346 6. Jongema Y. List of edible insects of the world. 4 Abril 2012. Disponível:
347 <http://www.ent.wur.nl/UK/Edible+insects/Worldwide+species+list/>. Acessado:
348 22/10/2012.
- 349 7. Ramos-Elorduy J. Anthropo-entomophagy: Cultures, evolution and sustainability.
350 Entomology Research. 2009; 39: 271–288.
- 351 8. Costa-Neto EM, Ramos-Elorduy J. Los Insectos Comestibles de Brasil: Etnicidad,
352 Diversidad e Importancia em la Alimentación. Boletín Sociedad Entomológica
353 Aragonesa. 2006: 423-442.
- 354 9. Ramos MIL, Ramos-Filho MM, Hiane PA, Braga-Neto JÁ, Siqueira EMA.
355 Qualidade nutricional da polpa da bocaiúva *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd.
356 Ciência e Tecnologia de Alimentos. 2008; 28: 90-94.
- 357 10. Dessimoni-Pinto NAV, Silva VM, Batista AG, Vieira G, Souza CR, Dumont PV et
358 al. Características físico-químicas da amêndoa de macaúba e seu aproveitamento na
359 elaboração de barras de cereais. Alimentos e Nutrição. 2010; 21: 79-86.
- 360 11. Chuba CAM, Sanjinez-Argandoña EJ. Caracterização Biométrica, Física E Química
361 De Frutos Da Palmeira Bocaiuva *Acrocomia aculeata* (Jacq) Lodd. Revista Brasileira
362 de Fruticultura. 2011; 33: 1023-1028.

- 363 12. Estevan AO, Silva MA, Arena AC, Sanjinez-Argandoña EJ, Breda CA, Kassuya
364 CAL. Estudo do potencial antiinflamatório dos extratos de *Acrocomia aculeata* no
365 processo inflamatório agudo e crônico em modelos experimentais. Simpósio Brasil-
366 Japão 2010. Disponível: <[http://japao.org.br/simposio2010/wp-](http://japao.org.br/simposio2010/wp-content/uploads/2010/PA020.pdf)
367 content/uploads/2010/PA020.pdf>. Acessado: 19 Abril 2013.
- 368 13. Lescano CH, Iwamoto RD, Sanjinez-Argandoña EJ, Kassuya CAL. Diuretic and
369 Anti-Inflammatory Activities of the Microencapsulated *Acrocomia*
370 *aculeata* (Arecaceae) Oil on Wistar Rats. Journal of Medicinal Food. 2014; 00: 1-7.
- 371 14. AOAC International. Official methods of analysis of AOAC International. 2003; 17.
- 372 15. AOAC International. Official methods of analysis of AOAC International. 2005; 18.
- 373 16. Atwater WO, Woods CD. The chemical composition of american food materials.
374 Farmers' Bulletin. 1896; 28.
- 375 17. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification.
376 Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. 1959; 37: 911-917.
- 377 18. Rufino MSM, Alves RE, Brito ES, Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto F, Mancini-Filho
378 J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical
379 fruits from Brazil. Food Chemistry. 2010; 121: 996–1002.
- 380 19. Oliveira CFR, Luz LA, Paiva PMG, Coelho LCBB, Marangoni S, Macedo MLR.
381 Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool
382 with potential for the control of insects. Process Biochemistry. 2011; 46: 498–504.
- 383 20. STATSOFT. Statistica: data analysis software systems. Version 8.0. Tulsa: StatSoft.
384 2008.
- 385 21. GraphPad. GraphPad Prism. Version 3.0. San Diego: GraphPad; 1999.
- 386 22. TACO - tabela brasileira de composição de alimentos. 4. ed. rev. e ampl. Campinas:
387 UNICAMPNEPA, 2011.
- 388 23. Dutra-De-Oliveira JED, Marchini JS. Ciências nutricionais: aprendendo a aprender.
389 2. Ed. São Paulo: SARVIER; 2008.
- 390 24. FAO. Fats and fatty acids in human nutrition. Report of an expert consultation. FAO
391 Food Nutr Pap. 2010; 91: 1-166.
- 392 25. Drin G. Topological Regulation of Lipid Balance in Cells. Annual Review of
393 Biochemistry. 2014; 83: 51-77.
- 394 26. Prinz WA. The lipid trade. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2014; 15.

- 395 27. Rodriguez-Amaya DB. Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability
396 and antioxidant activity of food carotenoids-A review. *Journal of Food Composition*
397 and *Analysis*. 2010; 23: 726-740.
- 398 28. Longvah T, Mangthya K, Ramulu P. Nutrient composition and protein quality
399 evaluation of eri silkworm (*Samia ricinii*) prepupae and pupae. *Food Chemistry*.
400 2011; 128: 400-403.
- 401 29. Ramos-Elorduy J, Costa Neto EM, Santos JF, Moreno JPMP, Landero-Torres I,
402 Campos SCA, et al. Estudio comparativo del valor nutritivo de varios coleoptera
403 comestibles de México y *Pachymerus nucleorum* (Fabricius, 1792) (Bruchidae) de
404 Brasil. *Interciencia*. 2006; 31: 512-516.
- 405 30. Shockley M, Dossey AT. Insects for Human Consumption. In: Morales-Ramos JA,
406 Rojas MG, Shapiro-Ilan, DI. *Mass Production of Beneficial Organisms*. Academic
407 Press, 1 ed. 2013. pp. 764.
- 408 31. ANVISA. Ministério da Saúde. Portaria no 27. Dispõe sobre o Regulamento Técnico
409 sobre Informação Nutricional Complementar. 1998.
- 410 32. Willhelm FF, Oliveira RB, Coutinho VF. Composição nutricional de dietas para
411 emagrecimento publicadas em revistas não científicas: comparação com as
412 recomendações dietéticas atuais de macronutrientes. *Nutrire*. 2014; 39: 179-186.
- 413 33. Zuo R, Ai Q, Mai K, Xu W. Effects of conjugated linoleic acid on growth, non-
414 specific immunity, antioxidant capacity, lipid deposition and related gene expression
415 in juvenile large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) fed soyabean oil-based diets.
416 *British Journal of Nutrition*. 2013; 110: 1220-1232.
- 417 34. Marineli RS, Marques AC, Furlan CPB, Maróstica JRMR. Antioxidant effects of the
418 combination of conjugated linoleic acid and phytosterol supplementation
419 in *Sprague–Dawley* rats. *Food Research International*. 2012; 49: 487–493.
- 420 35. Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M et al. Total
421 antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by
422 three different in vitro assays. *The Journal of Nutrition*. 2003; 133: 2812-2819.
- 423 36. Aranceta J, Pérez-Rodrigo C. Recommended dietary reference intakes, nutritional
424 goals and dietary guidelines for fat and fatty acids: a systematic review. *British*
425 *Journal of Nutrition*. 2012; 107: 8-22

- 426 37. Innocenti A, Franzoni F, Pruneti C. The Role of Nutrients in a Dietary Intervention
427 in Improving Blood Cholesterol Profile and Lowering Cardiovascular Risk. Journal
428 of Basic & Applied Sciences. 2014; 10: 96-101.
- 429 38. Polgár L. The catalytic triad of serine peptidases. Cellular and molecular life
430 sciences. 2005; 62: 61-72.
- 431 39. Morais AAC, Silva AL. Valor nutritivo e funcional da soja. Revista Brasileira de
432 Nutrição Clínica. 2000; 15: 306-315.

Capítulo II

VALOR ALIMENTÍCIO DE LARVAS DE *Tenebrio molitor* L.
(COLEOPTERA, TENEBRIONIDAE) CRIADAS COM
FARINHA DE POLPA DE *Acrocomia aculeata* (JACQ.) LODD.
EX MART. (ARECACEAE)

O manuscrito foi elaborado de acordo com as normas da revista Plos One, a qual será submetido.

1 **Resumo**

2 Os insetos têm desempenhado um importante papel na alimentação humana ao
3 longo da história, principalmente na África, Ásia e América Latina. Dentre as espécies
4 de insetos comestíveis destaca-se *Tenebrio molitor* Linnaeus, 1758 (Coleoptera,
5 Tenebrionidae), cujas larvas são consumidas especialmente na África, Ásia, Américas e
6 Austrália. *T. molitor* é um coleóptero facilmente criado em cativeiro e requer manejo
7 simples. Na região do Cerrado brasileiro a bocaiuva (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd)
8 é abundante e fornece frutos com valor nutricional elevado. O objetivo deste estudo foi
9 determinar a composição química das larvas de *T. molitor* criadas em diferentes dietas
10 artificiais com adição de farinha de polpa de bocaiuva. As larvas foram analisadas
11 quanto a sua composição nutricional, composição de ácidos graxos, atividade
12 antioxidante, atividade trípica e fatores anti-nutricionais. Os resultados demonstram que
13 as larvas de *T. molitor* criadas em dieta artificial com adição de bocaiuva são ótima
14 fonte proteica (44,83%) e lipídica (40,45%). Apresentam concentrações significativas
15 de ácidos graxos insaturados (65,99%), atividade antioxidante (4,5 µM trolox/g de óleo
16 extraído das larvas) e ausência de fatores anti-nutricionais. Este estudo permite indicar
17 nova fonte de biomassa para criação de *T. molitor*, demonstrando que é possível criar *T.*
18 *molitor* em dieta artificial com adição de farinha de bocaiuva, sem comprometer a
19 qualidade nutricional das larvas.

20

21 **Palavras-chave:** Entomofagia, Coleoptera, Ácidos graxos, Biomassa, Bocaiuva, Dietas
22 artificiais.

23

24

25 **Abstract**

26 Insects have played an important role in food throughout history, especially in
27 Africa, Asia and Latin America. Among the species of edible insects stands out
28 *Tenebrio molitor* Linnaeus, 1758 (Coleoptera, Tenebrionidae), whose larvae are eaten
29 especially in Africa, Asia, the Americas and Australia. *T. molitor* is a Coleoptera easily
30 reared in captivity and requires simple handling. In the region of the Brazilian Cerrado,
31 the bocaiuva (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd) is abundant and provides fruit with
32 high nutritional value. The aim of this study was to determine the chemical composition

33 of the larvae of *T. molitor* reared in different artificial diets with added bocaiuva's pulp.
34 The larvae were analyzed for their nutritional composition, fatty acid composition,
35 antioxidant activity, trypsin activity and anti-nutritional factors. The results demonstrate
36 that the larvae of *T. molitor* reared on artificial diet with added bocaiuva are great
37 protein source (44.83%) and lipid (40.45%). Presented significant levels of unsaturated
38 fatty acids (65.99%), antioxidant activity (4.5 μ M Trolox /g oil extracted from larvae)
39 and absence of anti-nutritional factors. This study allowed indicate new source of
40 biomass for creating molitor, demonstrating that it is possible to rear this beetle species
41 on artificial diet with added bocaiuva flour without compromising the nutritional quality
42 of the larvae.

43

44 **Keywords:** Entomophagy, Coleoptera, Fatty acids, Biomass, Bocaiuva, Artificial diets.

45

46

47 **Introdução**

48 Os insetos têm desempenhado um importante papel na alimentação humana ao
49 longo da história, principalmente na África, Ásia e América Latina [1,2]. Atualmente,
50 foram catalogadas mais de 2000 espécies de insetos comestíveis ao redor do mundo [3],
51 incluindo 135 no Brasil [4]. Para a segunda metade do século XXI prevê-se o aumento
52 rápido da população, o que acarretará menor disponibilidade de alimentos,
53 especialmente de proteína animal [5,6].

54 De acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e
55 Alimentação (FAO) [7] em 2050 seremos nove bilhões de pessoas, o que demandará
56 mais fontes de alimentos disponíveis. Em 2013, após a Conferência Internacional sobre
57 Florestas para Segurança Alimentar e Nutricional, a FAO publicou um relatório [8] que
58 incentiva o consumo de insetos como forma de combater a fome e promover a
59 segurança alimentar, por serem fonte de proteínas de boa qualidade nutricional para
60 humanos.

61 Apesar de desafiador, a introdução de novos itens alimentares na dieta humana
62 encontra precedente; ou seja, impressões negativas sobre certos tipos de alimentos
63 podem ser reconsideradas. Consumidores descobriram que certos queijos com cheiro e
64 sabor fortes podem ser muito gostosos, e que o consumo de animais vivos (ex.: ostras) e
65 carne crua (ex.: sashimi, carpaccio) é hoje um fato comum [9].

66 Parece bastante ilógico que a ingestão de invertebrados como lagostas e
67 camarões (que se alimentam de material em decomposição) seja considerada normal na
68 alimentação humana; enquanto o consumo de insetos (também invertebrados e
69 artrópodes, alguns exclusivamente herbívoros) seja visto com preconceito [10]. A
70 informação de que os insetos apresentam alto valor nutricional e que podem ser criados
71 de forma sustentável, permite quebrar barreiras do preconceito e possibilitar seu uso
72 como fonte alimentícia ou suplemento alimentar.

73 Os insetos são muito eficientes na biotransformação de matéria orgânica (alta
74 taxa de conversão alimentar) tornando-se biomassa com alto valor nutritivo [11,12]. Por
75 exemplo, larvas de insetos (de varias espécies) criadas em cativeiro, em condições pré-
76 estabelecidas, transformam biomassa de plantas em biomassa animal até 10 vezes mais
77 eficientemente que o gado [8]. Isso ocorre principalmente devido à característica
78 pecilotérmica dos insetos (“animais de sangue-frio”). Ou seja, gastam menos energia
79 para manter o calor do corpo, pois utilizam o ambiente para regular a temperatura
80 corporal [12].

81 Assim, a criação de insetos pode ser um meio de produção alimentar sustentável
82 e de menor impacto ambiental que a pecuária convencional [13]. Atualmente, um quarto
83 das terras do mundo é usado para a criação de 1,7 bilhões de cabeças de gado, enquanto
84 um terço das terras aráveis é usado para o plantio de grãos que sustentam a pecuária
85 [14]. A produção em massa de insetos para consumo humano utilizando métodos
86 industriais é tecnicamente viável. Um criadouro de besouros para suprir a necessidade
87 proteica de 100 pessoas ocuparia apenas 40m³ [15]. Exemplos recentes de insetos
88 comestíveis sendo comercialmente criados para consumo humano incluem o grilo
89 doméstico *Acheta domesticus* L., o gorgulho da palmeira, *Rhynchophorus ferrugineus*
90 Olivier, 1790, barata d’água, *Lethocerus indicus*, Lepeletier & Serville, 1825
91 (Belostomatidae) na Tailândia, e besouros aquáticos na China [15].

92 Dentre as espécies de insetos comestíveis destaca-se o besouro das farinhas
93 *Tenebrio molitor* Linnaeus, 1758 (Coleoptera, Tenebrionidae), por ser mais consumido,
94 especialmente na África, Ásia, Américas e Austrália. É uma das espécies de insetos que
95 apresenta maior quantidade de proteínas (47,76 a 53,13%) e lipídios (27,25 a 38,26%),
96 cuja contribuição energética varia de 379 a 573 kcal/100g. Considerando que o valor
97 energético diário para um indivíduo adulto é de 2000 kcal/dia, 100g de tenébrios

98 atendem, aproximadamente, um quarto da necessidade energética diária. Portanto, o
99 aporte energético dos insetos pode ser importante para a segurança alimentar [16,17,18].

100 *T. molitor* é um dos maiores besouros que infestam produtos alimentícios em
101 armazéns, principalmente de grãos. Os tenébrios começam a depositar seus ovos a partir
102 de 4 a 17 dias após a cópula. Uma única fêmea pode gerar em média 500 ovos. O
103 desenvolvimento embrionário dura de 4 a 6 dias, podendo ser acelerado com o leve
104 aumento da temperatura (25 a 27°C). O período larval é de aproximadamente 3 meses e
105 é nesta fase que o inseto é consumido, sendo que uma larva adulta pesa em média 0,2g e
106 mede 25-35mm de comprimento. Após este período a larva se transforma em pupa, cujo
107 estágio dura 5 a 6 dias dando origem ao indivíduo adulto [19].

108 Para a criação de insetos em cativeiro é necessário administrar dietas artificiais,
109 geralmente constituídas de folhas e grãos. Na região do Cerrado brasileiro a palmeira
110 *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. (Arecaceae), conhecida por bocaiuva ou
111 macaúba é abundante e fornece frutos com alta capacidade nutricional [20,21,22] e
112 anti-inflamatória [23,24], devido principalmente à presença de carotenoides e de ácidos
113 graxos.

114 O óleo da polpa da bocaiuva apresenta predominância de ácidos graxos
115 monoinsaturados, em especial do ácido oleico. Os ácidos graxos insaturados
116 desempenham importantes funções no organismo humano como, por exemplo, na
117 manutenção do sistema imunológico contra processos inflamatórios [24].

118 Diante disso, foram elaboradas dietas alternativas com farinha de bocaiuva
119 visando favorecer o aumento da concentração de ácidos graxos insaturados nas larvas
120 de *T. molitor*. Assim, a comparação do valor nutritivo das larvas alimentadas com
121 diferentes dietas permitirá indicar novas fontes de biomassa que aumentem o valor
122 nutricional do tenébrio. Do exposto, o objetivo deste trabalho foi determinar a
123 composição química das larvas de tenébrio criadas em diferentes dietas com adição de
124 farinha de polpa de bocaiuva.

125

126

127

128

129

130

131 **Material e Métodos**

132 **Material**

133 Larvas de *Tenebrio molitor* foram adquiridas de um criadouro particular em São
134 Paulo-SP (Atraki). As larvas da segunda geração foram criadas sob quatro dietas
135 constituídas de: farinhas de trigo, de soja, de polpa de bociuva e de amêndoa de
136 bociuva desidratada. As farinhas de trigo e de soja foram adquiridas no mercado local.
137 Os frutos de bociuva foram coletados em Dourados-MS e, após higienização foram
138 separadas a polpa e a amêndoa, desidratadas em estufa com circulação de ar,
139 separadamente, a 45°C durante 48 horas. Depois disso foram trituradas e peneiradas em
140 tamis com abertura de malha de 355µm, obtendo-se as respectivas farinhas.

141

142 **Nutrição das larvas**

143 As larvas de *T. molitor* adquiridas foram mantidas em caixas de poliestireno
144 expandido (40 x 30 x 25cm) durante 30 dias até completar o ciclo de vida. As rações
145 oferecidas às larvas de *T. molitor* da segunda geração foram divididas em quatro dietas:
146 (A) 50% de farinha de trigo e 50% de farinha de soja (dieta controle); (B) 50% de dieta
147 controle e 50% de farinha de polpa de bociuva; (C) 50% de dieta controle e 50% de
148 amêndoa de bociuva e (D) 50% de farinha de polpa de bociuva e 50% de amêndoa de
149 bociuva.

150 Foram colocadas aproximadamente 400 larvas de *T. molitor* por caixa, de acordo
151 com o manejo alimentar de cada dieta (A, B, C e D). A temperatura média foi de 25°C,
152 com umidade relativa do ar de 80% e fotoperíodo de 10h de luz (0,18Klux) x 14h de
153 escuro (0Klux). Após 90 dias, as larvas foram coletadas e congeladas a -6°C, mantendo-
154 se armazenadas nessa temperatura até realização das análises.

155

156 **Composição nutricional**

157 Foram determinadas a composição nutricional das quatro dietas (A, B, C e D) e
158 das larvas alimentadas com as dietas A e B. Foram analisados os teores de umidade em
159 estufa [25]; minerais em mufla a 550°C [25]; lipídios por extração com éter de petróleo
160 utilizando o equipamento de Soxhlet [25]; o teor de proteínas foi quantificado pela
161 determinação do nitrogênio presente na amostra realizada pelo método Kjeldahl [25],

162 utilizando o fator de conversão 6,25; fibras por extração ácida e alcalina [26]. A
163 determinação de carboidratos foi feita por diferença (100g de amostra – umidade-
164 minerais-lipídios-proteínas-fibras). O valor energético foi calculado utilizando-se os
165 coeficientes de *Atwater* que considera 4 kcal/g de amostra para proteínas e carboidratos
166 e 9 kcal/g de amostra para lipídios [27].

167

168 **Composição de ácidos graxos**

169 O óleo das larvas de *T. molitor* alimentadas com as dietas A e B foi extraído de
170 acordo com o método de Bligh & Dyer [28]. Para a transesterificação dos triglicerídeos,
171 aproximadamente 50mg da matéria lipídica extraída foram transferidos para tubos
172 falcon de 15mL, aos quais foram adicionados 2mL de n-heptano. A mistura foi agitada
173 até a completa dissolução da matéria graxa e foram adicionados 2mL de KOH 2 mol/L
174 em metanol. A mistura foi agitada por aproximadamente 5min e após a separação das
175 fases, 1mL da fase superior (heptano e ésteres metílicos de ácidos graxos) foi
176 transferido para frascos eppendorf de 1,5mL. Os frascos foram hermeticamente
177 fechados, protegidos da luz e armazenados em freezer a -18°C, para posterior análise
178 cromatográfica.

179 A composição de ácidos graxos foi determinada por cromatografia gasosa,
180 utilizando-se cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama (GCHA-
181 Shimadzu). Para a eluição foi empregada uma coluna capilar de sílica fundida de 100m
182 x 0,25mm x 0,20µm (SP-2560). A temperatura do forno foi programada para iniciar em
183 100°C e foi mantida assim por 1min, quando foi elevada a 170°C a 6,5°C/min.

184 Posteriormente, outra elevação de 170 a 215°C foi realizada a 2,75°C/min. e a
185 temperatura foi mantida por 12min. Finalmente, uma última elevação foi realizada de
186 215 para 230°C a 40°C/min. As temperaturas do injetor e detector foram de 270 e
187 280°C, respectivamente.

188 As amostras de 0,5µL foram injetadas em modo “split” (1:20), utilizando-se
189 nitrogênio como gás carreador a uma velocidade de arraste de 1ml/min. A identificação
190 dos ésteres metílicos de ácidos graxos foi realizada por comparação com os tempos de
191 retenção dos compostos da amostra com os padrões (Sigma) eluídos nas mesmas
192 condições das amostras.

193

194 **Análise da atividade antioxidante**

195 O extrato foi preparado a partir da mistura de 1g de óleo e 50 ml de solução
196 hidrometanólica (50%). Após repouso de 60min., o material foi centrifugado (4000rpm)
197 por 15min e o sobrenadante retirado. Ao sedimento foi adicionada 40ml de acetona
198 (70%) para realizar a segunda extração seguindo-se o procedimento da 1ª extração. Os
199 sobrenadantes das duas extrações foram misturados, transferidos para um balão (100ml)
200 e o volume completado com água destilada, obtendo-se o extrato.

201 O radical ABTS^{•+} (2, 2 AZINO BIS-3-ethylbenzo thiazoline 6 sulfonic acid
202 diammonium) foi formado pela reação de ABTS^{•+} (7mM) com persulfato de potássio
203 (140mM), a mistura reagiu por 16h à temperatura ambiente e na ausência de luz,
204 obtendo-se a solução radicalar. Para as análises, a solução radicalar foi diluída em
205 etanol até absorvância de 0,70 (\pm 0,05) a 734nm (espectrofotômetro Biospectro).
206 Aliquotas de 30 μ l de amostra foram adicionadas a 3ml da solução diluída de ABTS^{•+} e
207 as absorvâncias da mistura foram registradas após 6min. A atividade antioxidante foi
208 calculada utilizando-se da curva-padrão de 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido
209 carboxílico (Trolox). A curva-padrão foi preparada a partir de soluções etanólicas de
210 Trolox nas concentrações de 100; 500; 1000; 1500 e 2000 μ M [29]. Os resultados foram
211 expressos em μ M de Trolox/g de extrato. Cada determinação foi realizada em triplicata.

212

213 **Análise das atividades trípica e quimotríptica**

214 As atividades trípica e quimotríptica foram realizadas em microplacas [30]. O
215 ensaio utiliza a hidrólise de substratos cromogênicos BApNA (N- α Benzoyl-D-L-
216 Arginine p-Nitroanilide) para tripsina e SAAPFPNA (Succinil Alanina Alanina PF p-
217 Nitroanilide) para quimotripsina.

218 A atividade trípica da larva de *T. molitor* alimentada com a dieta A (50%
219 farinha de trigo e 50% farinha de soja) foi feita incubando as amostras com Tris-HCl
220 50mM, pH 8,0 para um volume final de 70 μ l. Após adição do substrato o tempo de
221 ensaio foi de 30min a 37°C. O resultado desta análise foi expresso em
222 nmol/BApNA/min. e UI/ml. A atividade quimotríptica larval foi analisada incubando as
223 amostras com Tris-HCl 50mM, pH 8,0 para um volume final de 100 μ l. Após adição do
224 substrato o tempo de ensaio foi de 10min. a 37°C e a reação lida em Leitor de

225 Microplacas Multiskan Go a 410nm. O resultado desta análise foi expresso em nmol/
226 SAAPFPNA/min. e UI/ml.

227 Nos ensaios enzimáticos para análise do potencial anti-tríptico e anti-
228 quimotríptico das larvas foi adicionado 10µl de tripsina bovina, no anti-tríptico, e 10µl
229 de quimiotripsina bovina, no anti-quimotríptico, para que seja determinado se possuem
230 ação inibitória sobre esta enzima. Após adição do Tris-HCl 50mM, pH 8,0 foram
231 adicionados os respectivos substratos como descrito nos ensaios tríptico e quimotríptico
232 das larvas, prosseguindo a incubação e leitura no a 410nm. Para cada ensaio e amostra
233 foram feitas três replicatas. As reações foram lidas em Leitor de Microplacas Multiskan
234 Go a 410nm.

235

236 **Análise estatística**

237 Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos
238 como média e desvio padrão. As comparações dos valores médios entre os grupos
239 foram realizadas pela análise de variância (ANOVA) e as diferenças comparadas pelo
240 teste de Tukey ao nível de significância de $p < 0,05$ com auxílio do programa Statistica
241 versão 8.0 [31] e Prism 3.0 [32].

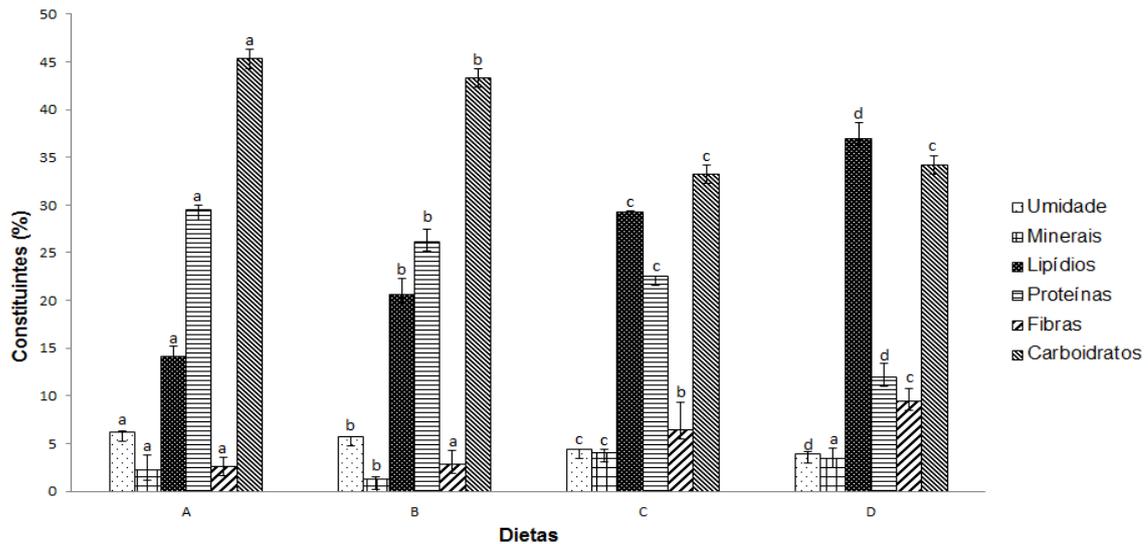
242

243

244 **Resultados e Discussão**

245 **Composição nutricional das dietas**

246 A composição nutricional das dietas elaboradas para a criação de larvas de
247 tenébrio é apresentada na Fig. 1. A dieta controle (A) apresentou maior conteúdo de
248 carboidratos e proteínas, conforme era esperado por ser constituída de trigo e soja. A
249 substituição parcial da dieta controle pela farinha e amêndoa de bocaiuva (dietas B e C)
250 influenciou na composição de nutrientes, observa-se redução significativa ($p < 0,05$) nos
251 teores de umidade, de proteínas e de carboidratos e aumento significativo ($p < 0,05$) nas
252 quantidades de minerais e lipídios em relação às dietas controle A e dieta B.



253

254 **Figura 1. Composição nutricional de dietas (A, B, C e D) para criação de larvas de**
 255 ***Tenebrio molitor* (Coleoptera, Tenebrionidae).** (A) 50% de farinha de trigo e 50% de
 256 farinha de soja (dieta controle); (B) 50% de dieta controle e 50% de farinha de polpa de
 257 bociiuva; (C) 50% de dieta controle e 50% de amêndoa de bociiuva e (D) 50% de
 258 farinha de polpa de bociiuva e 50% de amêndoa de bociiuva. Letras diferentes em
 259 colunas correspondentes diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

260

261 Na dieta D, constituída por 50% de farinha de polpa de bociiuva e 50% de
 262 amêndoa de bociiuva (Fig. 1), além das alterações significativas no conteúdo de lipídios
 263 (36,93%) e proteínas (12,03%), houve aumento no teor de fibras (9,43%). Essas
 264 alterações já eram esperadas devido aos constituintes nutricionais da polpa e da
 265 amêndoa de bociiuva [22]. O valor energético total em 100g da dieta controle (A) foi
 266 414kcal e das dietas B, C e D foram 450, 487, 517kcal, respectivamente.

267

268 Os insetos sobreviveram durante todo o estagio larval nas quatro dietas (A, B, C
 269 e D). Porém, após 130 dias, ao chegar à fase adulta, os besouros da dieta C e D
 270 morreram, provavelmente devido ao elevado teor de lipídios (29,28% e 36,93%) dos
 271 respectivos substratos (Fig. 1). A alta concentração de óleo favoreceu a aglomeração do
 272 substrato dificultando a aeração e movimentação dos insetos.

272

273 É considerado que o excesso de óleo pode interferir na respiração do besouro
 274 que é realizada através de traqueias localizadas no abdômen do indivíduo adulto [33].
 275 Para os insetos das Dietas A e B a duração do período adulto não foi influenciada pela
 276 dieta consumida, sendo de 16 dias, condizente com Aguilar-Miranda et al. [19] que
 afirma que a vida do besouro adulto pode variar de 4 a 17 dias após a cópula. Em

277 função desses resultados, somente foram determinadas a composição nutricional das
 278 larvas das dietas A e B.

279

280 **Composição nutricional das larvas**

281 A composição nutricional das larvas de *T. molitor* alimentados com as dietas A
 282 (50% farinha de trigo e 50% farinha de soja) e B (50% controle e 50% farinha de polpa
 283 de bociuiva) é apresentada na Tabela 1. Larvas de ambas as dietas apresentaram
 284 maiores quantidades de nutrientes em comparação com alimentos convencionais. O
 285 conteúdo de minerais nas larvas foi maior que as carnes de frango, bovina, suína e peixe
 286 [35]. Os minerais são compostos químicos inorgânicos necessários em pequenas
 287 quantidades, pois contribuem na formação dos tecidos, favorecem a transmissão dos
 288 impulsos nervosos e a contração muscular. Participam na manutenção do equilíbrio
 289 acidobásico, sendo os mais conhecidos: cálcio, ferro, magnésio, zinco e iodo [36].

290

291

292

293 **Tabela 1. Composição nutricional das larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera,**
 294 **Tenebrionidae) criadas em dietas artificiais A e B (fotoperíodo 10hL x 14hE,**
 295 **T=25°C) e de alimentos convencionais.**

296

Amostras	Umidade (g/100g)	Minerais (g/100g)	Lipídios (g/100g)	Proteínas (g/100g)	Carboidratos	
					Fibras (g/100g)	Amido (g/100g)
Larvas T. molitor (A)	51,91±0,78 ^a	3,85±0,12 ^a	39,05±2,06 ^a	50,07±0,76 ^a	18,84±1,01 ^a	-
Larvas T. molitor (B)	52,78±0,87 ^a	4,76±0,67 ^a	40,45±0,42 ^a	44,83±0,40 ^b	13,42±1,38 ^b	-
Larvas T. molitor**	56,27	3,54	50,15	40,98	-	-
Frango*	63,6	2,2	57,42	42,58	N.A.	-
Ovo *		4,24	44,88	48,51	N.A.	-
Carne bovina*	52,7	1,9	67,23	35,31	N.A.	-
Carne suína*	36,9	2,22	48,02	47,58	N.A.	-
Peixe *	59,9	2,49	48,88	49,63	N.A.	-

297 Valores apresentados em massa seca com \pm desvio padrão, n=3. (A) dieta constituída de farinha de soja e
298 de trigo, (B) dieta constituída de 50% de farinha de soja e de trigo e 50% de farinha de polpa de bocaiuva.
299 * TACO - Tabela brasileira de composição de alimentos, 2011. NA = não aplicável.**[34]. Média com
300 sobrescritos diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si ($p<0,05$).
301

302 O percentual de lipídios das larvas foi de 39,05% (dieta A) e 40,45% (dieta B).
303 Os lipídios são importantes na dieta, pois são vitais ao funcionamento biológico e
304 estrutural das células e auxiliam no transporte de vitaminas lipossolúveis, essenciais
305 para a nutrição do organismo. Além disso, intensificam a palatabilidade dos alimentos
306 através da absorção e retenção de sabores [37], bem como influenciam na textura dos
307 alimentos conferindo maciez e crocância. Energicamente, são importantes porque
308 produzem 9kcal/g quando oxidados no organismo. Esta importante fonte energética para
309 os seres humanos contribui, em alguns países, com 30-40% do total de energia
310 consumida na alimentação [36,37].

311 É considerado que a digestibilidade das proteínas de insetos é comparável com
312 as de carnes convencionais [38]. O teor de proteínas das larvas (44,83 a 50,07%) foi
313 maior aos alimentos considerados ricos em proteínas como, por exemplo, o frango
314 (42,58%) e a carne bovina (35,31%) (Tabela 1). Porém, nota-se que há uma gama de
315 valores reportados de proteína total da larva de *T. molitor*, variando de 49,8% a 76,14%
316 [16]. Outros autores [17] relacionam essa variação na composição nutricional ao fato de
317 que ainda não foram criadas metodologias padrões para a criação de insetos ou para sua
318 alimentação.

319 A alta concentração de proteínas e sua digestibilidade são indicadores de que
320 esses insetos podem ser empregados tanto na produção de alimentos para consumo
321 humano como na produção de ração animal. Foi constatado que os tenébrios apresentam
322 44,09% de aminoácidos essenciais, o que demonstra a qualidade das proteínas, podendo
323 ser utilizadas como multimisturas nutritivas [17].

324 A proteína animal é superior a vegetal, portanto os melhores suplementos
325 proteicos devem incluir alguma proteína animal [39]. Muitos desses produtos contêm
326 proteína derivada do leite, cuja produção causa um impacto ambiental muito maior do
327 que dos insetos [39]. Esse tipo de produto produzido à base de insetos enfrenta uma
328 barreira de aceitabilidade relativamente baixa, pois visam consumidores com
329 consciência nutricional e ambiental, e a origem da proteína não é visivelmente ou
330 palatalmente distinguível (ex.: a substituição da soja em pó por inseto em pó não altera

331 a aparência, sabor ou textura do produto) [39]. Ou seja, o uso de insetos na indústria
332 alimentícia pode constituir um ingrediente de alta qualidade proteica para um
333 suplemento proteico de elevado padrão.

334 Outra importante contribuição das larvas de tenébrio são as fibras, as larvas de
335 ambas as dietas apresentaram alto teor de fibras (Tabela 1). O consumo de alimentos
336 ricos em fibras está associado com a redução de risco cardiovascular, redução de níveis
337 glicêmicos e lipídicos associados à diminuição de hiperinsulinemia. O alto consumo
338 acarreta menores riscos para o desenvolvimento da obesidade [40].

339 Este estudo demonstra que as larvas de *T. molitor* alimentadas com dieta contendo
340 farinha de polpa de bociuva (dieta B) são fontes de fibras, visto que a quantidade
341 apresentada é superior a 6,0g/100g, conforme estabelece a Portaria nº 27/1998 da
342 Agência Nacional de Vigilância Sanitária [41].

343 Considerando-se as necessidades diárias de um humano adulto em relação aos
344 minerais (2,8g), proteínas (60g), lipídios (65g) e fibras (30g) [36], 30g de larvas
345 atenderiam, respectivamente, 51%, 23%, 19% e 13% desses nutrientes.

346

347

348

349 **Composição de ácidos graxos e atividade antioxidante**

350 A composição de ácidos graxos do óleo extraído das larvas de *T. molitor* (dietas
351 A e B) é apresentada na Tabela 2. Não houve diferenças significativas entre os ácidos
352 graxos das larvas das dietas A e B, com exceção da presença (0,12%) de ácido caprílico
353 (C8:0) nas larvas da dieta B.

354

355 **Tabela 2. Composição de ácidos graxos do óleo de larvas de *Tenebrio molitor***
356 **(Coleoptera, Tenebrionidae) criadas em dietas artificiais A e B (fotoperíodo 10hL**
357 **x 14hE, T=25°C).**

358

Ácidos graxos	Larvas de <i>T. molitor</i>		Carne bovina*	Carne suína**
	Dieta A (%)	Dieta B (%)		
Ácido Caprílico (C8:0)	-	0,12±0,01	0,50	-
Ácido Láurico (C12:0)	0,53 ±00,1 ^a	0,64±0,01 ^a	0,30	0,01
Ácido Mirístico (C14:0)	4,26±0,09 ^a	4,35±0,04 ^a	4,0	0,16
Ácido Palmítico (C16:0)	21,07±0,12 ^a	21,18±0,09 ^a	23,0	16,66
Ácido Esteárico (C18:0)	6,88±0,13 ^a	6,95±0,11 ^a	-	3,16
Ácido Araquídico (C20:0)	0,46±0,01 ^a	0,48±0,01 ^a	-	0,55

Ácido Palmítico (C16:1)	1,87±0,05 ^a	1,89±0,03 ^a	6,0	0,12
Ácido Oleico (C18:1)	52,78±0,23 ^a	53,09±0,18 ^a	43,0	0,48
Ácido Linoleico (C18:2)	11,45±0,29 ^a	10,78±0,21 ^a	2,0	-
Ácido α-Linolênico (C18:3)	0,18±0,01 ^a	0,23±0,01 ^a	2,0	1,12
Ácido Eicosapentaenoico-CLA (C20:5)	0,39±0,01	0,27±0,01		
Σ AGS	33,2	33,72	27,80	20,92
Σ AGM	54,65	54,98	49,0	24,16
Σ AGPI	11,63	11,01	4,0	47,44

359 Valores expressos em média n=3 e desvio padrão. AGS: ácidos graxos saturados. AGM: ácidos graxos
360 monoinsaturados. AGPI: ácidos graxos poli-insaturados. (A) dieta constituída de farinha de soja e de
361 trigo, (B) dieta constituída de 50% de farinha de soja e de trigo e 50% de farinha de polpa de bociuiva.
362 *[42]**[43]. Médias com sobrescrito diferente na mesma linha diferem significativamente entre si
363 (p<0,05).

364

365 As larvas das dietas A e B apresentaram concentrações satisfatórias de ácidos
366 graxos essenciais. Os ácidos graxos essenciais são poli-insaturados e não são
367 sintetizados pelas células dos mamíferos e, portanto, têm que ser ingeridos na
368 alimentação. Os ácidos graxos essenciais são o linoleico (18:2 n-6) e o α -linolênico
369 (18:3 n-3) [36].

370 Esses ácidos graxos atuam como precursores para a síntese de ácidos graxos
371 poli-insaturados de cadeia longa como os ácidos araquidônico, eicosapentaenóico e
372 docosahexaenóico. Esses ácidos graxos são necessários para manter, sob condições
373 normais, as membranas celulares, as funções cerebrais e a transmissão de impulsos
374 nervosos. Participam da transferência do oxigênio atmosférico para o plasma sanguíneo,
375 da síntese da hemoglobina e da divisão celular [44].

376 Apesar das dietas A e B possuírem menos ácido α -linolênico (0,18% e 0,23%)
377 em comparação com a carne bovina (2,0%) e a carne suína (1,12%), a concentração de
378 ácido linoleico dessas larvas (11,45% e 10,78%) foi notoriamente superior à das carnes
379 convencionais (2,0% e 0%).

380 Os ácidos graxos poli-insaturados das séries ômega-3 (C18:3 e C20:5) e ômega-
381 6 (C18:2) apresentam principais efeitos na prevenção de doenças cardiovasculares e
382 tipos de câncer [37]. A alta concentração de ácidos graxos no óleo afeta sua atividade
383 antioxidante, que é altamente desejada na dieta humana [37].

384 O ácido linoleico conjugado (CLA) está presente nos produtos cárneos e tem
385 demonstrado ter atividade antioxidante [42,43]. O CLA pode diminuir o acúmulo de
386 ácidos graxos saturados nas membranas celulares, tornando essas membranas menos
387 susceptíveis à oxidação e, desta forma, têm menor potencial de causar danos oxidativos
388 aos componentes celulares [45,46].

389 Alguns exemplos de antioxidantes nas carnes, além do CLA, incluem os
390 minerais, a carnosina e a glutathione [47]. A atividade antioxidante do óleo das larvas de
391 *T. molitor* (dieta A) avaliada pelo método ABTS, que possibilita o uso de extratos
392 hidrofílicos e lipofílicos, foi de 4,5 µM trolox/g, valor superior ao de óleos
393 convencionais como o de soja (2,2 µM trolox/g) e o de girassol (1,17 µM trolox/g) [35].
394

395 **Atividade trípica e fatores anti-nutricionais**

396 O processo chave para a digestão de proteínas é mediado por enzimas
397 proteolíticas secretadas pelo pâncreas, que auxiliam diretamente a digestão e ativam
398 outras enzimas intestinais [49]. Dentre essas enzimas, destaca-se a tripsina, encontrada
399 nos sistemas digestório de muitos vertebrados que necessitam hidrolisar e absorver
400 proteínas.

401 A atividade da tripsina tem papel fundamental no processo de hidrólise e
402 conseqüentemente na absorção de proteínas, pois essas moléculas são grandes para
403 serem absorvidas pelo intestino [50]. A presença de inibidores de tripsina influencia
404 negativamente a absorção e aproveitamento das proteínas provenientes da dieta, pois o
405 inibidor liga-se à enzima tripsina impedindo-a de realizar sua função [50].

406 As larvas de *T. molitor* (dieta A) foram submetidas à análise de atividade
407 trípica, anti-trípica, quimotrípica e anti-quimotrípica. A atividade da enzima tripsina
408 das larvas foi $0,144 \pm 0,003$ nmol BAPNA/min. A presença de tripsina sugere que o
409 consumo dessas larvas como alimento pode gerar maior disponibilidade de
410 aminoácidos. Corroborando com essa hipótese, constatou-se a ausência de fatores anti-
411 nutricionais (atividade anti-trípica e anti-quimotrípica) nas larvas de *T. molitor*. Não
412 houve atividade quimotrípica.

413

414

415 **Conclusões**

416 Dietas artificiais com teor de lipídios abaixo de 29% favoreceram o
417 desenvolvimento de besouros de *Tenebrio molitor*.

418 Larvas de *Tenebrio molitor* criadas em dieta artificial com adição de bocaiuva
419 são ótima fonte proteica e lipídica, apresentam concentrações significativas de ácidos
420 graxos insaturados, atividade antioxidante e ausência de fatores anti-nutricionais.

421 Este estudo permite indicar dietas artificiais com adição de farinha de polpa de
422 bocaiuva como nova fonte de biomassa para criação de *Tenebrio molitor*.

423 Larvas criadas em dietas com adição de farinha de polpa de bocaiuva são um
424 recurso alimentício altamente nutritivo para a segurança alimentar e para o uso em
425 suplementos proteicos para atletas e pessoas interessadas em aumentar o consumo de
426 proteínas.

427

428

429 **Agradecimentos**

430 À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do
431 Estado de Mato Grosso do Sul - FUNDECT pelo apoio financeiro.

432

433

434 **Referências**

- 435 1. Schiefenhövel W, Blum P. Insects: Forgotten and rediscovered as food.
436 Entomophagy among the Eipo, highlands of West New Guinea, and in other
437 traditional societies. In: MacClancy, J., Henry, J. and Macbeth, H. Consuming the
438 Inedible, Berghahn Books, New York; 2009. pp. 163-176.
- 439 2. Defoliart G. The human use of insects as a food resource: a bibliographic account in
440 progress. 2012. Disponível: <http://www.food-insects.com>. Acessado 21 Março 2014.
- 441 3. Jongema Y. List of edible insects of the world. 4 Abril 2012. Disponível:
442 <http://www.ent.wur.nl/UK/Edible+insects/Worldwide+species+list/>. Acessado:
443 22/10/2012.
- 444 4. Costa-Neto, E.M.; Ramos-Elorduy, J. Los Insectos Comestibles de Brasil: Etnicidad,
445 Diversidad e Importancia em la Alimentación. Boletín Sociedad Entomológica
446 Aragonesa. 2006: 423-442.
- 447 5. Mitsuhashi J. The future use of insects as human food. In: Forest Insects as Food:
448 Humans Bite Back, FAO of the United Nations Regional Office for Asia and the
449 Pacific, Bangkok; 2010. pp. 115-122.
- 450 6. Ingram J. A food systems approach to researching food security and its interactions
451 with global environmental change. Food Security. 2011; 3: 417-431.

- 452 7. FAO. How to feed the world in 2050? 2009. Disponível em:
453 http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_
454 [World_in_2050.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf). Acessado: 28 Agosto 2014.
- 455 8. FAO. Forest insects as food: Humans bite back. FAO of the United Nations Regional
456 Office for Asia and the Pacific, Bangkok, 2010.
- 457 9. Johnson DV. The contribution of edible forest insects to human nutrition and forest
458 management. In: Forest Insects as Food: Humans Bite Back, FAO of the United
459 Nations Regional Office for Asia and the Pacific, Bangkok; 2010. pp. 5-22.
- 460 10. Costa-Neto EM. Manual de Entomologia/MT SEA. Manuales e Tesis, Sociedade
461 Entomológica Aragonesa. Zaragoza; 2002.
- 462 11. Oonincx DG, van Itterbeeck J, Heetkamp MJ, van den Brand H, van Loon JJ, van
463 Huis A. An exploration on greenhouse gas and ammonia production by insect species
464 suitable for animal or human consumption. PLoS One. 2010; 5(12): e144445.
- 465 12. Premalatha M, Abbasi T, Abbasi T, Abbasi SA. Energy-efficient food production to
466 reduce global warming and ecodegradation: the use of edible insects. Renewable and
467 Sustainable Energy Reviews. 2011; 15: 4357–4360.
- 468 13. Durst, PB, Shono K. Edible forest insects: Exploring new horizons and traditional
469 practices. In: Forest Insects as Food: Humans Bite Back, FAO of the United Nations
470 Regional Office for Asia and the Pacific, Bangkok; 2010. pp. 1-4.
- 471 14. Worldwatch Institute. Estado do Mundo 2010: Transformando Culturas do
472 Consumismo à Sustentabilidade. Washington: UMA Editora; 2010. Disponível:
473 http://www.akatu.org.br/akatu_acao/publicacoes/reflexoes-sobre-o-consumo-
474 [consciente](http://www.akatu.org.br/akatu_acao/publicacoes/reflexoes-sobre-o-consumo-consciente). Acessado: 17/09/2014.
- 475 15. Van Huis A. Potential of Insects as Food and Feed in Assuring Food Securit. Annual
476 Review of Entomology. 2013; 58: 563-583.
- 477 16. Bednářová M, Borkovcová M, Mlček J, Rop O, Zeman L. Edible Insects – Species
478 Suitable For Entomophagy Under Condition Of Czech Republic. Acta Universitatis
479 Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis. 2013; 16.
- 480 17. Rumpold BA, Schluter OK. Potential and challenges of insects as an innovative
481 source for food and feed production. Innovative Food Science Emerging
482 Technologies. 2013; 17: 1-11.

- 483 18. Yoo J, Hwang J, Go T, Yun E. Comparative Analysis of Nutritional and Harmful
484 Components in Korean and Chinese Mealworms (*Tenebrio molitor*). Journal of the
485 Korean Society of Food Science and Nutrition. 2013; 42: 249-254.
- 486 19. Aguilar-Miranda ED, Lopez MG, Escamilla-Santana C, De La Rosa BAP.
487 Characteristics of maize flour tortilla supplemented with ground *Tenebrio molitor*
488 Larvae. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2002; 50: 192-195.
- 489 20. Ramos MIL, Ramos-Filho MM, Hiane PA, Braga-Neto JÁ, Siqueira EMA.
490 Qualidade nutricional da polpa da bocaiúva *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd.
491 Ciência e Tecnologia de Alimentos. 2008; 28: 90-94.
- 492 21. Dessimoni-Pinto NAV, Silva VM, Batista AG, Vieira G, Souza CR, Dumont PV, et
493 al. Características físico-químicas da amêndoa de macaúba e seu aproveitamento na
494 elaboração de barras de cereais. Alimentos e Nutrição. 2010; 21: 79-86.
- 495 22. Chuba CAM, Sanjinez-Argandoña EJ. Caracterização Biométrica, Física E Química
496 De Frutos Da Palmeira Bocaiuva *Acrocomia aculeata* (Jacq) Lodd. Revista Brasileira
497 de Fruticultura 2011; 33: 1023-1028.
- 498 23. Estevan AO, Silva MA, Arena AC, Sanjinez-Argandoña EJ, Breda, CA, Kassuya,
499 CAL. Estudo do potencial antiinflamatório dos extratos de *Acrocomia aculeata* no
500 processo inflamatório agudo e crônico em modelos experimentais. Simpósio Brasil-
501 Japão 2010. Disponível: [http://japao.org.br/simposio2010/wp-](http://japao.org.br/simposio2010/wp-content/uploads/2010/PA020.pdf)
502 [content/uploads/2010/PA020.pdf](http://japao.org.br/simposio2010/wp-content/uploads/2010/PA020.pdf). Acessado: 19 Abril 2013.
- 503 24. Lescano CH, Iwamoto RD, Sanjinez-Argandoña EJ, Kassuya CAL. Diuretic and
504 Anti-Inflammatory Activities of the Microencapsulated *Acrocomia*
505 *aculeata* (Arecaceae) Oil on Wistar Rats. Journal of Medicinal Food. 2014; 00: 1-7.
- 506 25. AOAC International. Official methods of analysis of AOAC International. 2003; 17.
- 507 26. AOAC International. Official methods of analysis of AOAC International. 2005; 18.
- 508 27. Atwater WO, Woods CD. The chemical composition of american food materials.
509 Farmers' Bulletin. 1896; 28.
- 510 28. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification.
511 Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. 1959; 37: 911-917.
- 512 29. Rufino MSM, Alves RE, Brito ES, Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto F, Mancini-Filho
513 J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical
514 fruits from Brazil. Food Chemistry. 2010; 121: 996–1002.

- 515 30. Oliveira CFR, Luz LA, Paiva PMG, Coelho LCBB, Marangoni S, Macedo MLR.
516 Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool
517 with potential for the control of insects. *Process Biochemistry*. 2011; 46: 498–504.
- 518 31. STATSOFT. Statistica: data analysis software systems. Version 8.0. Tulsa: StatSoft.
519 2008.
- 520 32. GraphPad. GraphPad Prism. Version 3.0. San Diego: GraphPad; 1999.
- 521 33. Ruppert EE, Fox RS, Barnes RD. *Zoologia dos Invertebrados*. 7^a ed. São Paulo:
522 Roca; 2005.
- 523 34. Siemianowska E, Kosewska A, Aljewicz M, Skibniewska KA, Polak-Juszczak L,
524 Jarocki A, et al. Larvae of mealworm (*Tenebrio molitor* L.) as European novel food.
525 *Agricultural Sciences*. 2013; 4: 287-291.
- 526 35. TACO - Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. 4. Ed. Campinas:
527 UNICAMPNEPA, 2011.
- 528 36. Dutra-De-Oliveira JED, Marchini JS. *Ciências nutricionais: aprendendo a aprender*.
529 2. Ed. São Paulo: SARVIER; 2008.
- 530 37. FAO. Fats and fatty acids in human nutrition. Report of an expert consultation. FAO
531 Food and Nutrition Paper. 2010; 91: 1-166.
- 532 38. Longvah T, Mangthya K, Ramulu P. Nutrient composition and protein quality
533 evaluation of eri silkworm (*Samia ricinii*) prepupae and pupae. *Food Chemistry*.
534 2011; 128: 400-403.
- 535 39. Shockley M, Dossey AT. Insects for Human Consumption. In: Morales-Ramos JA,
536 Rojas MG, Shapiro-Ilan, DI. *Mass Production of Beneficial Organisms*. Academic
537 Press, 1 ed. 2013. pp. 764.
- 538 40. Willhelm FF, Oliveira RB, Coutinho VF. Composição nutricional de dietas para
539 emagrecimento publicadas em revistas não científicas: comparação com as
540 recomendações dietéticas atuais de macronutrientes. *Nutrire*. 2014; 39: 179-186.
- 541 41. ANVISA. Ministério da Saúde. Portaria no 27. Dispõe sobre o Regulamento Técnico
542 sobre Informação Nutricional Complementar. 1998.
- 543 42. Araujo JMA. *Química de alimentos: teoria e prática*. 5. Ed. Viçosa, MG: Ed. UFV;
544 2011.
- 545 43. Kralik G, Marieta V, Suchý P, Straková E. Effects of dietary supplementation with
546 rapeseed and lin- seed oil on the composition of fatty acids in porcine mus- cle
547 tissue. *Acta Veterinaria Brno* 2010; 79: 363-367.

- 548 44. Yehuda S, Rabinovitz S, Carasso RL, Mostofsky DI. The role of polyunsaturated
549 fatty acids in restoring the aging neuronal membrane. *Neurobiology Aging*. 2002; 23:
550 843-53.
- 551 45. Marineli RS, Marques AC; Furlan CPB, Maróstica JRMR. Antioxidant effects of the
552 combination of conjugated linoleic acid and phytosterol supplementation
553 in *Sprague–Dawley* rats. *Food Research International*. 2012; 49: 487-493.
- 554 46. Zuo R, Ai Q, Mai K, Xu W. Effects of conjugated linoleic acid on growth, non-
555 specific immunity, antioxidant capacity, lipid deposition and related gene expression
556 in juvenile large yellow croaker (*Larmichthys crocea*) fed soyabean oil-based diets.
557 *British Journal of Nutrition*. 2013; 110: 1220-1232.
- 558 47. Decker EA, Faustman C, Lopez-Bote CJ. Antioxidants in Muscle Foods. *Nutritional*
559 *Strategies to Improve Quality*. New York: John Wiley & Sons, Inc.; 2000.
- 560 48. Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M et al. Total
561 antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by
562 three different in vitro assays. *The Journal of Nutrition*. 2003; 133: 2812-2819.
- 563 49. Karasov WH, Hume ID. Vertebrate gastrointestinal system. In *Handbook of*
564 *Comparative Physiology* (ed. W. Dantzler). Bethesda, MD: American Physiological
565 Society; 1997. pp. 409-480.
- 566 50. Polgár L. The catalytic triad of serine peptidases. *Cellular and molecular life*
567 *sciences*. 2005; 62: 61-72.

Conclusão Geral

Os resultados do primeiro capítulo mostraram que as larvas de *Pachymerus nucleorum* são ótima fonte proteica e lipídica com concentrações significativas de ácidos graxos insaturados em relação à amêndoa de bocaiuva.

As larvas e as amêndoas de bocaiuva apresentaram ausência de fatores anti-nutricionais o que favorece seu uso na alimentação humana.

No segundo capítulo, determinou-se que dietas artificiais com teor de lipídios abaixo de 29% favoreceram o desenvolvimento de besouros de *Tenebrio molitor*.

Larvas de *T. molitor* criadas em dieta artificial com adição de farinha de polpa de bocaiuva são ótima fonte proteica e lipídica, apresentam concentrações significativas de ácidos graxos insaturados, atividade antioxidante e ausência de fatores anti-nutricionais.

O conhecimento gerado por esses dois trabalhos contribuiu para a definição de novas fontes de biomassa que permitem, futuramente, a obtenção de produtos alimentícios direcionados a esportistas ou pessoas que necessitem de consumo suplementar de proteínas. O uso de insetos na alimentação humana é um nicho em potencial para o combate à fome e à desnutrição das populações com baixos recursos financeiros.

Os estudos do aproveitamento das larvas de *P. nucleorum* obtidas da amêndoa da bocaiuva e da criação em cativeiro de *T. molitor* em dietas com adição de farinha da polpa de bocaiuva contribuem para a preservação dessa espécie que é uma palmeira nativa do Cerrado.

Anexo

Normas para submissão dos artigos à revista Plos One.

1. Format Requirements

Manuscript Organization

PLOS ONE considers manuscripts of any length. There are no explicit restrictions for the number of words, figures, or the length of the supporting information, although we encourage a concise and accessible writing style. We will **not** consider monographs.

All manuscripts should be double-spaced and include line numbers and page numbers.

Manuscripts should begin with the ordered sections:

- Title
 - Authors
 - Affiliations
 - Abstract
 - Introduction
- and end with the sections of:

- Acknowledgments
- References

- Supporting Information Captions

Figures should be cited in ascending numeric order upon first appearance. Each figure caption should then be inserted immediately after the first paragraph in which it is cited in the article file.

Figures should not be included in the main manuscript file. Each figure must be prepared and submitted as an individual file. Find more information about preparing figures.

Tables should be cited in ascending numeric order upon first appearance. Each table should then be inserted immediately after the first paragraph in which it is cited in the article file.

The title, authors, and affiliations should all be included on a title page as the first page of the manuscript file.

There are no explicit requirements for section organization between these beginning and ending sections. Articles may be organized in different ways and with different section titles, according to the authors' preference. In most cases, internal sections include:

- Materials and Methods
- Results
- Discussion
- Conclusions (optional)

PLOS ONE has no specific requirements for the order of these sections, and in some cases it may be appropriate to combine sections. Guidelines for individual sections can be found.

Abbreviations should be kept to a minimum and defined upon first use in the text. Non-standard abbreviations should not be used unless they appear at least three times in the text.

Standardized nomenclature should be used as appropriate, including appropriate usage of species names and SI units.

PLOS articles do not support text footnotes. If your accepted submission contains footnotes, you will be asked to move that material into either the main text or the reference list, depending on the content.

Manuscript File Requirements

Authors may submit their manuscript files in Word (as .doc or .docx), LaTeX (as .pdf), or RTF format. Word files must not be protected.

LaTeX Submissions. If you would like to submit your manuscript using LaTeX, you must author your article using the *PLOS ONE* LaTeX template and BibTeX style sheet. Articles prepared in LaTeX may be submitted in PDF format for use during the review process. After acceptance, however, .tex files will be required. Please consult our LaTeX guidelines for a list of what will be required.

Microsoft Word Submissions with Equations. If your manuscript is or will be in Microsoft Word and contains equations, you must follow the instructions below to make sure that your equations are editable when the file enters production.

1. Format display equations only in MathType.
2. Inline equations should be completely input via MathType. Do not include an equation that is part text, part MathType.
3. Do not use graphic objects.
If you have already composed your article in Microsoft Word and used its built-in equation editing tool, your equations will become unusable during the typesetting process. To resolve this problem, re-key your equations using MathType.

If you do not follow these instructions, PLOS will not be able to accept your file.

2. Guidelines for Standard Sections

Title

Manuscripts must be submitted with both a full title and a short title, which will appear at the top of the PDF upon publication if accepted. Only the full title should be included in the manuscript file; the short title will be entered during the online submission process.

The full title must be 250 characters or fewer. It should be specific, descriptive, concise, and comprehensible to readers outside the subject field. Avoid abbreviations if possible. Where appropriate, authors should include the species or model system used (for biological papers) or type of study design (for clinical papers).

Examples:

- Impact of Cigarette Smoke Exposure on Innate Immunity: A *Caenorhabditis elegans* Model
 - Solar Drinking Water Disinfection (SODIS) to Reduce Childhood Diarrhoea in Rural Bolivia: A Cluster-Randomized, Controlled Trial
- The short title must be 50 characters or fewer and should state the topic of the paper.

Authors and Affiliations

All author names should be listed in the following order:

- First names (or initials, if used),
- Middle names (or initials, if used), and
- Last names (surname, family name)

Each author should list an associated department, university, or organizational affiliation and its location, including city, state/province (if applicable), and country. If the article has been submitted on behalf of a consortium, all author names and affiliations should be listed at the end of the article.

This information cannot be changed after initial submission, so please ensure that it is correct.

To qualify for authorship, one should contribute to **all** of the following:

1. Conception and design of the work, acquisition of data, or analysis and interpretation of data
2. Drafting the article or revising it critically for important intellectual content
3. Final approval of the version to be published
4. Agreement to be accountable for all aspects of the work

All persons designated as authors should qualify for authorship, and all those who qualify should be listed. Each author must have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content. Those who contributed to the work but do not qualify for authorship should be listed in the acknowledgments.

When a large group or center has conducted the work, the author list should include the individuals whose contributions meet the criteria defined above, as well as the group name.

All authors must approve the final manuscript before submission. PLOS ONE will contact all authors by email at submission to ensure that they are aware of the submission of the manuscript.

One author should be designated as the corresponding author, and his or her email address or other contact information should be included on the manuscript cover page. This information will be published with the article if accepted.

See the PLOS Editorial and Publishing Policies for more information.

Abstract

The abstract should:

- Describe the main objective(s) of the study
- Explain how the study was done, including any model organisms used, without methodological detail
- Summarize the most important results and their significance
- Not exceed 300 words

Abstracts should **not** include:

- Citations
- Abbreviations, if possible

Introduction

The introduction should:

- Provide background that puts the manuscript into context and allows readers outside the field to understand the purpose and significance of the study
- Define the problem addressed and why it is important
- Include a brief review of the key literature
- Note any relevant controversies or disagreements in the field
- Conclude with a brief statement of the overall aim of the work and a comment about whether that aim was achieved

Materials and Methods

This section should provide enough detail to allow suitably skilled investigators to fully replicate your study. Specific information and/or protocols for new methods should be included in detail. If materials, methods, and protocols are well established, authors may cite articles where those protocols are described in detail, but the submission should include sufficient information to be understood independent of these references.

We encourage authors to submit detailed protocols for newer or less well-established methods as Supporting Information. Further information about formatting Supporting Information files, can be found.

Methods sections of papers on research using **human or animal subjects and/or tissue or field sampling** must include required ethics statements. See the Reporting Guidelines for human research, clinical trials, animal research, and observational and field studies for more information.

Methods sections of papers with **data that should be deposited in a publicly available database** should specify where the data have been deposited and provide the relevant accession numbers and version numbers, if appropriate. Accession numbers should be provided in parentheses after the entity on first use. If the accession numbers have not yet been obtained at the time of submission, please state that they will be provided during review. They must be provided prior to publication. A list of recommended repositories for different types of data can be found.

Methods sections of papers using **cell lines** must state the origin of the cell lines used. See the Reporting Guidelines for cell line research for more information.

Methods sections of papers adding **new taxon names** to the literature must follow the Reporting Guidelines below for a new zoological taxon, botanical taxon, or fungal taxon.

Results, Discussion, and Conclusions

These sections may all be separate, or may be combined to create a mixed Results/Discussion section (commonly labeled "Results and Discussion") or a mixed Discussion/Conclusions section (commonly labeled "Discussion"). These sections may be further divided into subsections, each with a concise subheading, as appropriate. These sections have no word limit, but the language should be clear and concise.

Together, these sections should describe the results of the experiments, the interpretation of these results, and the conclusions that can be drawn. Authors should explain how the results relate to the hypothesis presented as the basis of the study and provide a succinct explanation of the implications of the findings, particularly in relation to previous related studies and potential future directions for research.

PLOS ONE editorial decisions do not rely on perceived significance or impact, so authors should avoid overstating their conclusions. See the *PLOS ONE* Publication Criteria for more information.

Acknowledgments

People who contributed to the work but do not fit the *PLOS ONE* authorship criteria should be listed in the acknowledgments, along with their contributions. You must ensure that anyone named in the acknowledgments agrees to being so named.

Funding sources should **not** be included in the acknowledgments, or anywhere in the manuscript file. You will provide this information during the manuscript submission process.

References

General guidelines

- PLOS uses the reference style as outlined in the ICMJE sample references, also referred to as the “Vancouver” style.
 - References must be listed at the end of the manuscript and numbered in the order that they appear in the text.
 - In the text, citations should be indicated by the reference number in brackets.
 - Authors may cite any and all available works in the reference list.
 - Authors may not cite unavailable and unpublished work, including manuscripts that have been submitted but not yet accepted (e.g., “unpublished work,” “data not shown”).
 - If an article is submitted to a journal and also publicly available as a pre-print, the pre-print may be cited.
 - If related work has been submitted to PLOS ONE or elsewhere, authors should include a copy with the submitted article as confidential supplementary information, for review purposes only.
 - Authors should not state 'unpublished work' or 'data not shown,' but instead include those data as supplementary material or deposit the data in a publicly available database.
 - Journal name abbreviations should be those found in the NCBI databases.
- Reference formatting

Because all references will be linked electronically as much as possible to the papers they cite, proper formatting of the references is crucial. References should be formatted as follows:

Published papers

1. Hou WR, Hou YL, Wu GF, Song Y, Su XL, Sun, B, et al. cDNA, genomic sequence cloning and overexpression of ribosomal protein gene L9 (rpL9) of the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). Genet Mol Res. 2011;10: 1576-1588.

Note: Use of a DOI number for the full-text article is acceptable as an alternative to or in addition to traditional volume and page numbers:

Devaraju P, Gulati R, Antony PT, Mithun CB, Negi VS. Susceptibility to SLE in South Indian Tamils may be influenced by genetic selection pressure on TLR2 and TLR9 genes. Mol Immunol. 2014 Nov 22. pii: S0161-5890(14)00313-7. doi: 10.1016/j.molimm.2014.11.005

Accepted, unpublished papers

Same as above, but “In press” appears instead of the page numbers or DOI.

Websites or online articles

1. Huynen MMTE, Martens P, Hilderlink HBM. The health impacts of globalisation: a conceptual framework. Global Health. 2005;1: 14. Available: <http://www.globalizationandhealth.com/content/1/1/14>.

Books

1. Bates B. Bargaining for life: A social history of tuberculosis. 1st ed. Philadelphia: University of Pennsylvania Press; 1992.

Book chapters

1. Hansen B. New York City epidemics and history for the public. In: Harden VA, Risse GB, editors. AIDS and the historian. Bethesda: National Institutes of Health; 1991. pp. 21-28.

Deposited articles (preprints, e-prints, or arXiv)

1. Krick T, Shub DA, Verstraete N, Ferreiro DU, Alonso LG, Shub M, et al. Amino acid metabolism conflicts with protein diversity; 1991. Preprint. Available: arXiv:1403.3301v1. Accessed 17 March 2014.

Published media (print or online newspapers and magazine articles)

1. Fountain H. For Already Vulnerable Penguins, Study Finds Climate Change Is Another Danger. The New York Times. 29 Jan 2014. Available: <http://www.nytimes.com/2014/01/30/science/earth/climate-change-taking-toll-on-penguins-study-finds.html>. Accessed 17 March 2014.

New media (blogs, websites, or other written works)

1. Allen L. Announcing PLOS Blogs. 2010 Sep 1 [cited 17 March 2014]. In: PLOS Blogs [Internet]. San Francisco: PLOS 2006 - . [about 2 screens]. Available: <http://blogs.plos.org/plos/2010/09/announcing-plos-blogs/>.

Masters' theses or doctoral dissertations

1. Wells A. Exploring the development of the independent, electronic, scholarly journal. M.Sc. Thesis, The University of Sheffield. 1999. Available: <http://cumincad.scix.net/cgi-bin/works/Show?2e09>.

Databases and repositories (Figshare, arXiv)

1. Roberts SB. QPX Genome Browser Feature Tracks; 2013. Database: figshare [Internet]. Accessed: http://figshare.com/articles/QPX_Genome_Browser_Feature_Tracks/701214.

Multimedia (videos, movies, or TV shows)

1. Hitchcock A, producer and director. Rear Window [Film]; 1954. Los Angeles: MGM.

Figure Legends

Figures should **not** be included in the manuscript file, but figure legends should be. Guidelines for preparing figures can be found.

Figure legends should describe the key messages of a figure. Legends should have a short title of 15 words or less. The full legend should have a description of the figure and allow readers to understand the figure without referring to the text. The legend itself should be succinct, avoid lengthy descriptions of methods, and define all non-standard symbols and abbreviations.

Figures should be cited in ascending numeric order upon first appearance. Each figure caption should be inserted immediately after the first paragraph in which they are cited in the article file. Further information about figure captions can be found in the Figure Guidelines.

Supporting Information Captions

Because Supporting Information is accessed via a hyperlink attached to its captions, captions must be listed in the article file. Do not submit a separate caption file. It is acceptable to have them in the file itself in addition, but they must be in the article file for access to be possible in the published version.

The file category name and number is required, and a one-line title is highly recommended. A legend can also be included but is not required. Supporting Information captions should be formatted as follows.

S1 Text. Title is strongly recommended. Legend is optional.

Please see our Supporting Information guidelines for more details.

Data Reporting Guidelines

All data and related metadata underlying the findings reported in a submitted manuscript should be deposited in an appropriate public repository, unless already provided as part of the submitted article. Repositories may be either subject-specific (where these exist) and accept specific types of structured data, or generalist repositories that accept multiple data types. We recommend that authors select repositories appropriate to their field. Repositories may be subject-specific (eg, GenBank for sequences and PDB for structures), general, or institutional, as long as DOIs or accession numbers are provided and the data are at least as open as CC BY. Authors are encouraged to select repositories that meet accepted criteria as trustworthy digital repositories, such as criteria of the Centre for Research Libraries or Data Seal of Approval. Large, international databases are more likely to persist than small, local ones.

To support data sharing and author compliance of the PLOS data policy, we have integrated our submission process with a select set of data repositories. The list is neither representative nor exhaustive of the suitable repositories available to authors. Current repository integration partners include: Dryad and figshare. Please contact data@plos.org to make recommendations for further partnerships.

Instructions for PLOS submissions with data deposited in an integration partner repository:

Deposit data in the integrated repository of choice. Once deposition is final and complete, the repository will provide the author with a dataset DOI (provisional) and private URL for reviewers to gain access to the data. Enter the given data DOI into the full Data Availability Statement, which is requested in the Additional Information section of the PLOS Submission form. Then provide the URL passcode in the Attach Files section. If you have any questions, please contact us at plosone@plos.org

Accession Numbers

All appropriate datasets, images, and information should be deposited in public resources. Please provide the relevant accession numbers (and version numbers, if appropriate). Accession numbers should be provided in parentheses after the entity on first use. Suggested databases include, but are not limited to:

- ArrayExpress
- BioModels Database
- Database of Interacting Proteins

- DNA Data Bank of Japan [DDBJ]
- DRYAD
- EMBL Nucleotide Sequence Database
- GenBank
- Gene Expression Omnibus [GEO]
- Protein Data Bank
- UniProtKB/Swiss-Prot
- ClinicalTrials.gov

In addition, as much as possible, please provide accession numbers or identifiers for all entities such as genes, proteins, mutants, diseases, etc., for which there is an entry in a public database, for example:

- Ensembl
- Entrez Gene
- FlyBase
- InterPro
- Mouse Genome Database (MGD)
- Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)
- PubChem

Providing accession numbers allows linking to and from established databases and integrates your article with a broader collection of scientific information.

Striking Images

Authors are encouraged to upload a "striking image" that may be used to represent their paper online in places like the journal homepage or in search results. The striking image must be derived from a figure or supporting information file from the paper, ie. a cropped portion of an image or the entire image. Striking images should ideally be high resolution, eye-catching, single panel images, and should ideally avoid containing added details such as text, scale bars, and arrows. If no striking image is uploaded, a figure from the paper will be designated as the striking image.

Please keep in mind that PLOS's Creative Commons Attribution License applies to striking images. As such, do not submit any figures or photos that have been previously copyrighted unless you have express written permission from the copyright holder to publish under the CCAL license. Note that all published materials in PLOS ONE are freely available online, and any third party is permitted to read, download, copy, distribute, and use these materials in any way, even commercially, with proper attribution.

Care should be taken with the following image types in particular:

1. PLOS ONE is unable to publish any images generated by Google software (Google Maps, Street View, and Earth)
2. Maps in general are usually copyrighted, especially satellite maps

3. Photographs
4. Commercial or government images, slogans, or logos
5. Images from Facebook or Twitter

Authors must also take special care when submitting manuscripts that contain potentially identifying images of people. Identifying information should not be included in the manuscript unless the information is crucial and the individual has provided written consent by completing the Consent Form for Publication in a PLOS Journal (PDF).

For license inquiries, e-mail [license \[at\] plos.org](mailto:license@plos.org).

Tables

Tables should be cited in ascending numeric order upon first appearance. Each table should be inserted immediately after the first paragraph in which it is cited in the article file. All tables should have a concise title. Footnotes can be used to explain abbreviations. Citations should be indicated using the same style as outlined above. Tables occupying more than one printed page should be avoided, if possible. Larger tables can be published as Supporting Information. Please ensure that table formatting conforms to our [Guidelines for table preparation](#).