



**João Miguel Damas  
Pinto**

**Otimização de processos de criação em massa de  
duas espécies de insetos para a formulação de  
rações de aquacultura**



**João Miguel Damas  
Pinto**

**Otimização de processos de criação em massa de duas espécies de insetos para a formulação de rações de aquacultura**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Aplicada, realizada sob a orientação científica do Doutora Olga Maria Correia Chitas Ameixa, Investigadora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

## **o júri**

|                     |   |
|---------------------|---|
| Presidente          | Doutora Isabel Maria Cunha Antunes Lopes, Investigadora Principal em Regime Laboral, CESAM & Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro       |
| Vogal – Arguente    | Doutor Marcelino Miguel Guedes de Jesus Oliveira, Investigador Auxiliar em Regime Laboral, CESAM & Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro |
| Vogal - Orientadora | Doutora Olga Maria Correia Chitas Ameixa, Investigadora Doutorada (nível 1), CESAM & Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro               |

## **agradecimentos**

À minha orientadora, Doutora Olga Ameixa, pela oportunidade que me deu em poder fazer parte deste grupo, pelo incansável apoio e pela disponibilidade em todas as atividades e dúvidas que surgiram ao longo do trabalho.

A todos os meus colegas com quem me fui cruzando no laboratório que mantiveram sempre o bom humor, na ajuda todos os dias no insectário e nas dúvidas que iam surgindo no decorrer dos trabalhos.

A todos os grupos de amigos que fiz por Aveiro, quer em Biologia, quer em Biologia e Geologia, e aos que ficaram pela terrinha, pelo incansável apoio, por todos os momentos passados ao longo destes vários anos.

Ao meu gato, Benurom, pelo suporte emocional e por me obrigar a levantar a horas decentes.

À minha família, pela ajuda durante toda a minha vida e pelo suporte financeiro prestado, que se mostrou essencial, porque sem eles teria sido impossível chegar a este momento.

## palavras-chave

*Hermetia illucens*, *Calliphora vicina*, Diodo emissor de luz, Reprodução em interior, Desenvolvimento larvar

## resumo

O contínuo aumento da população mundial tem levado a um aumento da pressão sobre o setor alimentar, nomeadamente, sobre a produção de produtos alimentares com elevado conteúdo em proteína. Os métodos de produção e as rações usadas na pecuária e na aquacultura exercem uma enorme pressão sobre os recursos naturais, que já são limitados. Neste cenário têm surgido novas opções alimentares, de entre as quais se incluem os insetos. Estes apresentam-se como uma opção sustentável para suprimir a demanda por ingredientes para a formulação de rações de alto valor proteico. Contudo, muitos processos de produção não se encontram otimizados e mais estudos serão necessários para alcançar esse propósito. Este trabalho teve como objetivo a compreensão de alguns desses processos com vista à sua otimização. No primeiro procurou-se determinar a quantidade de substrato ótima para que as larvas de *Calliphora vicina* se desenvolvam de forma adequada de forma a evitar carência ou excesso de alimento, através da avaliação das taxas de bioconversão, conversão de alimento e redução de substrato. No segundo, testou-se a influência do tipo de iluminação no comportamento reprodutivo das fêmeas de *Hermetia illucens*. Foram quantificados, o número de ovos, o peso dos ovos, o número de conjuntos de ovos e o número de ovos por fêmea. As larvas de *Calliphora vicina* não mostraram divergência no seu desenvolvimento em termos de peso, embora apresentem taxas de bioconversão e redução de substrato distintas consoante a quantidade de alimento fornecida. As fêmeas de *Hermetia illucens* demonstram performances reprodutivas diferenciais de acordo com o tipo de iluminação, tendo sido verificada uma melhor performance nas lâmpadas “branco frio” (LED1). Através da compreensão dos comportamentos e necessidades das duas espécies estudadas, os resultados obtidos poderão contribuir para aumentar a eficiência da criação em cativeiro destas duas espécies.

**keywords**

*Hermetia illucens*, *Calliphora vicina*, light-emitting diode, Indoor breeding, Larval development

**abstract**

The continuous increase of the world's population has led to the increased pressure on the food sector, particularly the production of protein products. The production methods and feeds used in livestock farming and aquaculture have high environmental impacts on natural resources, which are already limited. In this scenario, new feed alternatives have emerged, among these are insects. Insects are a sustainable option to suppress the demand for ingredients for the formulation of high protein value diets. However, many of the production processes lack optimisation, and further studies are necessary to achieve this purpose. This work aimed to optimise two of these processes. In the first one, it was studied the optimum amount of substrate to feed larvae of *Calliphora vicina* to develop adequately, avoiding lack or excess of feed, by evaluating bioconversion rate, food conversion rate, and substrate reduction. In the second, it was studied the influence of the type of illumination on the reproductive behaviour of *Hermetia illucens* females, by quantification of egg load, egg weight, the number of egg clusters and the number of eggs per female were. *Calliphora vicina* larvae did not show divergence in their development in terms of weight, although they showed distinct bioconversion and substrate reduction rates. The reproductive performance of *Hermetia illucens* was different according with the type of illumination and a better performance was verified in "cold white" lamps (LED1). The results of this work will contribute to improve the efficiency in the breeding of these two species through a greater understanding of their behaviour and needs.



# Índice

|  |    |
|--|----|
| Lista de figuras .....   | 2  |
| Lista de tabelas .....   | 3  |
| Lista de abreviaturas.....   | 4  |
| 1. Introdução.....   | 5  |
| 1.1 Ponto atual da produção de alimentos.....                                  | 5  |
| 1.2 Ingredientes alternativos.....   | 6  |
| 1.3 Insetos como parte da solução .....  | 8  |
| 1.4 Legislação atual e insetos permitidos.....                                 | 9  |
| 1.4.1 Alimentação humana.....  | 9  |
| 1.4.2 Alimentação animal.....  | 9  |
| 1.5 Potencial das espécies de insetos .....                                    | 11 |
| 1.6 Problemas de criação.....  | 12 |
| 1.7 Necessidade de otimização de metodologia .....                             | 13 |
| 1.8 Objetivos.....   | 14 |
| 2. Materiais e métodos.....  | 14 |
| 2.1 Organismos estudados.....  | 14 |
| 2.1.1 <i>Calliphora vicina</i> (Diptera, Calliphoridae).....                   | 14 |
| <b>2.1.2 <i>Nasonia vitripennis</i> (Himenoptera, Pteromalidae)</b> .....      | 15 |
| 2.1.3 <i>Hermetia illucens</i> (Diptera, Stratiomyidae).....                   | 15 |
| 2.2 Desenho experimental .....   | 16 |
| 2.2.1 <i>C. vicina</i> .....   | 16 |
| 2.2.1.1 Manutenção da colónia.....   | 16 |
| 2.2.1.2 Teste de alimentação .....   | 17 |
| 2.2.1.3 Análise estatística .....  | 18 |
| 2.2.1.4 Controlo e taxas de parasitismo na população de <i>C. vicina</i> ..... | 18 |
| 2.2.2 <i>H. illucens</i> .....   | 19 |
| 2.2.2.1 Manutenção da colónia.....   | 19 |
| 2.2.2.2 Teste de oviposição .....  | 20 |
| 2.2.2.3 Análise estatística .....  | 20 |
| 3. Resultados .....  | 21 |
| 3.1 <i>C. vicina</i> .....   | 21 |
| 3.1.1 Testes de alimentação.....   | 21 |
| 3.1.2 Taxas de parasitismo na população de <i>C. vicina</i> .....              | 22 |
| 3.2 Teste de oviposição <i>H. illucens</i> .....                               | 23 |
| 4. Discussão.....  | 24 |
| 4.1 <i>C. vicina</i> .....   | 24 |
| 4.2 <i>H. illucens</i> .....   | 25 |
| 5. Conclusão .....   | 26 |
| 6. Referências bibliográficas .....  | 27 |

## Lista de figuras

|   |    |
|---|----|
| Figura 1- Vantagens e desvantagens dos principais ingredientes alternativos para ração de peixes (adaptado de Ameixa et al., 2020).....   | 6  |
| Figura 2-Regras da EU atualmente aplicáveis para substratos e uso em alimentação animal (adaptado de IPFF, 2021) .....  | 10 |
| Figura 3- Indivíduo adulto de <i>C. vicina</i> .....  | 15 |
| Figura 4- Indivíduo adulto de <i>N. vitripennis</i> .....   | 15 |
| Figura 5- Indivíduo adulto de <i>H. illucens</i> .....  | 16 |
| Figura 6- Frascos com 2,5g; 5g e 10g divididos por 3 réplicas com 10 larvas de <i>C. vicina</i> por frasco .....  | 17 |
| Figura 7- Microtubo onde as pupas foram isoladas para o teste de parasitismo .....  | 19 |
| Figura 8- Variação do peso das larvas de <i>C. vicina</i> ao longo do tempo em função da quantidade de alimento inicial (2,5g; 5g; 10g). Valores são médias de 3 réplicas + erro padrão ..... | 21 |

## Lista de tabelas

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1- Valor dos parâmetros (média± Desvio padrão; n=3; p» 0,05) desvio padrão, taxa de conversão, taxa de bioconversão e taxa de redução de substrato para as larvas de <i>C. vicina</i> alimentados com diferentes quantidades de substrato. Letras diferentes representam diferenças significativas ..... | 21 |
| Tabela 2- Dados relativos à população do parasitoide ( <i>N. vitripennis</i> ).....   | 22 |
| Tabela 3- Dados relativos à oviposição de <i>H. illucens</i> sob dois tipos lâmpadas diferentes com diferentes espectros.....   | 23 |

## Lista de abreviaturas

Gases com Efeitos de Estufa (GEE)

Single Cell Protein (SCP)

Análise de Ciclo de Vida (ACV)

Autoridade europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA)

União Europeia (EU)

International Platform of Insects for Food and Feed (IPIFF)

*Hermetia illucens* (BSF)

Diodo emissor de luz (LED)

Eicosapentenoico (EPA)

# 1. Introdução

## 1.1 Ponto atual da produção de alimentos

Com a previsão de um aumento populacional que deverá atingir os 9 mil milhões de habitantes em 2050 (FAO, 2020), a insegurança alimentar já vivida em muitos países em desenvolvimento poderá agravar-se ainda mais, devido à incapacidade de produção de alimentos, afetando também países cuja preocupação em alimentar as suas populações ainda não existe. Em consequência do aumento dos rendimentos e da crescente urbanização, a demanda por produtos proteicos de origem animal deverá aumentar nos próximos anos, passando assim das 229 milhões de toneladas para 465 milhões de toneladas, até 2050 (FAO, 2013). Para assegurar a alimentação para toda a população estima-se que a produção alimentar mundial tenha de aumentar em 60% (Alexandratos e Bruinsma 2012). As dietas têm vindo a sofrer modificações, com uma tendência para o aumento do consumo de produtos de origem animal, sendo expectável que continue nas próximas décadas. Esta tendência deverá resultar, num aumento na pressão sobre a produção de proteína animal de forma a suprimir esta procura. Esta demanda por fontes de proteína animal não será exclusiva para alimentação humana direta, mas também para a produção de rações para a pecuária e para a aquacultura. Até recentemente a farinha de peixe era uma das principais fontes de proteína animal utilizadas na alimentação animal e junto com o óleo de peixe eram os principais ingredientes em rações para a pecuária e aquacultura, pela sua composição nutricional rica em proteínas e ácidos gordos polinsaturados. Contudo, nos últimos anos com a escassez dos stocks de peixe tem se aumentado a utilização de farinhas vegetais, sobretudo farinha de soja. No entanto a produção destes ingredientes possui grandes impactos ambientais (Sánchez-Muros et al., 2014), uma vez que se encontra intrinsecamente dependente dos recursos naturais, levando à degradação dos mesmos devido à sua sobre-exploração. Esta produção é feita à custa da desflorestação de importantes áreas naturais como por exemplo, a floresta Amazónica, utilizando grandes quantidades de água e degradando solos, e com recurso a agroquímicos. Para além da alimentação humana e animal, a soja é utilizada para a produção de biodiesel o que tem provocado um aumento dos preços dos fatores de produção nos sectores da pecuária e aquacultura. Atualmente, a plantação de oleaginosas ocupa cerca de 23% das terras aráveis a nível mundial, sendo que apenas 6% são utilizadas para alimentação humana (FAO, 2018).

Assim o aumento da procura por tais produtos, sobretudo a soja, poderá agravar ainda mais a situação atual (Makkar et al., 2014). O sistema agrícola atual é responsável por 30% de todas as emissões antropogénicas de gases com efeito de estufa (GEE) (Lal, 2021) e é estimado que a irrigação consome cerca de 90% dos recursos de água doce do planeta (Dalin, C., 2021). Dadas as restrições que têm vindo a ser impostas para o consumo de água, desflorestação e emissões de GEE, a expansão da área de arável de forma a aumentar a produção é também inviável (Pirker, J., 2016). A sobrepesca e as práticas de pesca irresponsável, apesar de serem reconhecidas como as principais causas do declínio da biodiversidade e alterações nos ecossistemas marinhos, continuam a aumentar a cada ano,

contribuindo para a redução dos estoques de peixe, assim como o aumento dos preços (Lotze et al., 2009; Worm et al., 2006). Em 2009, cerca de 57,4% dos estoques monitorizados pela Organização para a Alimentação e Agricultura (FAO), já tinham sido totalmente explorados e 29,9% estavam sobre-explorados (FAO, 2011).

A continuação da pesca intensiva nos oceanos, assim como o declínio de terras aráveis são assim insustentáveis para garantir a segurança alimentar. Assim é necessário encontrar soluções que possam garantir de forma sustentável a alimentação para toda a população sem comprometer ainda mais os recursos naturais do planeta (Draaisma et al., 2013).

## 1.2 Ingredientes alternativos

Na busca pelo aumento da sustentabilidade das produções, encontrar ingredientes alternativos é essencial. Tem também vindo a aumentar a sensibilidade dos consumidores para os problemas ambientais e nutricionais, inclusive sobre a necessidade de alterar os sistemas alimentares globais (Khan et al., 2016). Deste modo, várias opções com diferentes vantagens e desvantagens têm sido investigadas (Figura 1), que vão desde alternativas vegetais, fontes de proteína unicelular (Single cell protein - SCP), ou outros produtos de origem animal. Mais recentemente os insetos, têm vindo a ser fortemente considerados.

| Alternativas à farinha e óleo de peixe |   |                                  | +  | -   |  |
|--|---|----------------------------------|--|---|--|
|  |  | Alternativas baseadas em plantas | Farinha de oleaginosas<br>Algas marinhas<br>Farinha de plantas | Conteúdo proteico adequado; Baixo custo; Disponibilidade  | Fatores anti nutricionais; Competição com o mercado de alimentação humana e combustível; Não sustentável |
|  |  | Fontes de proteína unicelular    | Microalgas<br>Fungos<br>Bactérias                              | Conteúdo proteico e lipídico adequado   | Elevados custos; Dificuldade em obter uma biomassa alta; Carência em nutrientes essenciais               |
|  |  | Proveniente de animais           | Carne<br>Ossos<br>Sangue                                       | Conteúdo proteico adequado; Baixo custo; Disponibilidade  | Conteúdo lipídico não adequado; Vetor de doenças; Presença de antibióticos; Não sustentável              |
|  |  | Insetos                          | Farinha de inseto<br>Óleo de inseto<br>Inseto inteiro          | Conteúdo proteico, de vitaminas e aminoácidos adequado; Baixo custo; Ambientalmente sustentável | Conteúdo lipídico por vezes não adequado; Produção requer otimização; Legislação em falta                |

**Figura 1-** Vantagens e desvantagens dos principais ingredientes alternativos para ração de peixes (adaptado de Ameixa et al., 2020)

Alternativas de origem vegetal têm vindo a ser as mais utilizadas, com especial atenção para a soja, sobretudo pela sua composição nutricional, no que diz respeito ao conteúdo proteico e aminoácidos (Tacon, 1993). Para além da sua composição nutricional, a ampla utilização da soja advém também das suas propriedades físicas, que permitem manter uma composição consistente no seu processamento (Fang et al., 2016). Apesar disto é essencial ter em consideração que a aplicação do grão cru das dietas para aquacultura pode afetar negativamente os peixes, nomeadamente em relação à sua saúde e crescimento (Mosberian-

Tanha., et al., 2017). Embora haja formas de mitigar este efeito, por exemplo através de tratamento térmico, o principal fator negativo do uso da soja como alternativa centra-se nas condições associadas à sua produção. Esta depende da ocupação de vastas áreas de terra que foram convertidos em terrenos agrícolas, estando assim fortemente associada à desflorestação e fragilização de habitats (da Silva et al., 2010). A soja também é comumente produzida com o objetivo de entrar no mercado de biocombustíveis, que é um mercado que contribui para grandes flutuações nos preços dos grãos (Mitchell, 2008).

Plantas geneticamente modificadas também podem desempenhar um papel importante, servindo como ingrediente para rações (Garg et al., 2018). Estas apresentam-se como uma solução sustentável a longo prazo, sendo possível, através do uso de manipulação genética e cruzamentos específicos na reprodução, desenvolver plantas com maior concentração de nutrientes (Hirschi, KD, 2009). Contudo, estas modificações podem representar problemas para os consumidores, como aumento de alergénios endógenos ou anti nutrientes nas culturas, devido à inserção de novo material genético no genoma (Bryan et al., 2018).

Atualmente, das cerca de 250 espécies de macroalgas que já são comercializadas no mundo, cerca de 150 são utilizadas para alimentação humana. Estas constituem uma parte da dieta em vários países, especialmente no sudeste da Ásia e países do norte da Europa, onde são também utilizadas na alimentação de animais. Em 2004 30% de toda a produção mundial tinha como destino a formulação de rações para animais (Becker, 2004). Para além desta utilização, no ocidente são utilizados com fonte de alguns polissacarídeos, tais como, os alginatos e o agar, utilizados na alimentação e nas indústrias nutracêuticas e farmacêuticas. Do ponto de vista nutricional apresentam bons valores em proteína, vitaminas e minerais, embora estes apresentem elevada variação entre as espécies e pelas condições ambientais locais (Wells et al., 2017). Devido ao facto de possuírem na sua composição ácidos gordos polinsaturados ómega-3, são consideradas alimentos de alto valor nutritivo, potencialmente superiores para consumo quando comparadas com de origem vegetal (Wells et al., 2017; Ameixa et al., 2020).

A Produção de Proteína Unicelular (SCP) pode ser realizada através de diferentes fontes microbianas tais como, microalgas, fungos e bactérias (Jones et al., 2020). Microalgas são microrganismos fotossintéticos que demonstram a capacidade de produzir proteína e lípidos num teor semelhante às oleaginosas, mas com a vantagem de apresentarem uma composição rica em ácidos gordos polinsaturados ómega-3 (Lum et al., 2013; Correa et al., 2020; Xue et al., 2020). Os rendimentos de biomassa por área e capacidade de não requerer água potável para a produção torna-as atrativas para uma produção sustentável de larga escala (Torres-Tiji, et al., 2020). Os valores de vitaminas e minerais que estas apresentam retirariam as necessidades de suplementos alimentares usados nas rações da pecuária convencional (Madeira et al., 2017). Estas podem ser produzidas através de fluxos de resíduos como fonte nutricional. A produção pode ser realizada durante todo o ano e em climas mais frios, garantindo assim a constante disponibilidade do produto e permitindo que seja obtido em qualquer local (Smith et al., 2010; Cheregi et al., 2019). Apesar destes aspetos positivos,

melhorias tais como o desenvolvimento da escala para os níveis agrícolas padrão, avaliação e melhoria do conteúdo nutricional e o desenvolvimento de traços organoléticos serão fundamentais para tornar esta uma fonte de alimento regular (Torres-Tiji, et al. 2020).

As bactérias também já são usadas como fonte de alimento, principalmente na alimentação animal (Ritala et al, 2017). Estas bactérias contêm entre 50% a 80% de proteína quando se fala de peso seco (Anupama e Ravindra, 2000). O conteúdo em metionina pode chegar aos 3%, sendo mais elevado que nas microalgas e fungos (Schulz e Oslage, 1976). O alto conteúdo em ácidos nucleicos, de 8 a 12%, faz com que seja necessário um pré-tratamento antes da sua utilização como alimento, quer para alimentação humana, quer animal (Strong et al., 2015).

### **1.3 Insetos como parte da solução**

Nos últimos anos têm-se multiplicado o número de estudos onde os insetos surgem com elevado potencial devido ao seu ciclo de vida rápido, elevado número de indivíduos por geração, a elevada eficiência de conversão de alimentos (Collavo et al., 2005). Tradicionalmente, os insetos fazem parte da alimentação humana na Ásia, África e na América latina, fazendo parte da dieta de cerca de 2 mil milhões de pessoas. (FAO, 2013). Tratando-se de organismos poiquilotérmicos, os insetos não regulam a sua temperatura corporal através do seu próprio metabolismo, ao contrário dos homeotérmicos. Com este tipo de regulação corporal é possível otimizar a eficiência na conversão alimentar em ambiente controlado. A relação entre o crescimento corporal e a produção de dióxido de carbono é um indicador da eficiência da conversão dos alimentos e, por consequência, um indicador relevante do impacto ambiental provocado (de Vries e de Boer, 2010). De modo a avaliar o impacto ambiental total de uma produção de proteínas animais, é necessária uma Análise do Ciclo de Vida (ACV), na qual todos os fatores relacionados com a produção sejam tidos em consideração. As diferenças de impacto ambiental numa ACV podem ser explicadas principalmente por fatores como as emissões de Metano (CH<sub>4</sub>), eficiência de conversão de alimento e taxas de reprodução (Ooninx et al., 2010).

Insetos permitem produções mais sustentáveis, já que podem ser baseadas em resíduos orgânicos e inorgânicos e excessos de produções agrícolas (Yang et al., 2015), permitindo a transformação de desperdícios num produto alimentar de alto valor nutritivo. Em média 1 kg de biomassa de insetos podem ser produzidos a partir de 2 kg de biomassa alimentar (Collavo et al., 2005).

A produção de insetos em ambiente controlado é necessária para disponibilizar alimentos de forma contínua durante todo o ano, em zonas temperadas, uma vez que, muitos insetos estão disponíveis na natureza apenas sazonalmente. Aumentar a escala e a eficiência da produção de insetos, permite uma redução de custos, com o objetivo de obter o máximo de rendimento e redução dos impactos ambientais. Para a produção em ambientes controlados, é necessário controlo e otimização total do ambiente (temperatura, humidade relativa, luz), alimentação

de qualidade e prevenção de pragas (parasitas) e doenças, para maximizar o crescimento e desenvolvimento adequados dos insetos. A comercialização de produtos com origem nos insetos a larga escala poderá assegurar uma produção consistente em termos qualitativos e quantitativos. Assim, quando for possível produzir insetos em massa como fonte de alimento, poderá ser possível também reduzir os custos de produção e poderá substituir consideravelmente as restantes formas de obtenção de proteína animal (Khan et al., 2014).

## **1.4 Legislação atual e insetos permitidos**

### **1.4.1 Alimentação humana**

De forma a prosseguir com mudanças no setor alimentar, através da inclusão de insetos nas dietas, estes alimentos têm de ser submetidos a uma avaliação científica de forma a garantir a segurança para o consumidor, por parte da Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA). Estes também não deverão implicar, em termos nutricionais, uma desvantagem caso substituam um alimento semelhante ou induzir o consumidor em erro. A autorização servirá para estabelecer as condições do seu uso, a sua designação enquanto alimento/ingrediente alimentar e os requisitos em matéria de rotulagem. A lista de novos alimentos autorizados pela união europeia (EU) é estabelecida pelo Regulamento de Execução (EU) n.º 2017/2470.

Na primeira avaliação de risco da utilização de insetos para consumo humano e alimentação animal, publicada em outubro de 2015, a EFSA alertou para os perigos biológicos e químicos associados à criação de insetos para consumo humano e alimentação animal. Os principais riscos encontram-se associados às condições de produção e processamento dos mesmos. A EFSA aponta que os métodos de produção, os produtos usados para alimentar os insetos, o estágio de vida em que os insetos são colhidos, as espécies em questão, assim como os métodos usados no processamento posterior, terão impacto na possível presença de contaminantes químicos e/ou biológicos nos produtos finais. Todavia, dados existentes sobre a transferência de contaminantes de diferentes tipos de alimentos para o próprio inseto são limitados. Segundo a EFSA os insetos não apresentam um risco superior em relação a outros animais já largamente consumidos. Os principais riscos relacionam-se com a alimentação destes e não com os próprios insetos, sendo apenas permitido o uso de substratos já autorizados para a criação de outros animais. Na Europa existem produtores sediados em vários Estados-Membros da EU, nomeadamente naqueles que beneficiam das medidas transitórias para comercialização desses produtos.

### **1.4.2 Alimentação animal**

O número de estudos sobre a introdução dos insetos na alimentação animal sofreu um aumento após a aprovação do Regulamento (EU) n.º. 2017/893 que alterou o Regulamento (EC) n.º. 999/2001 e (EU) n.º. 142/2011, permitindo a utilização de sete espécies de insetos para alimentar animais de aquacultura. As espécies autorizadas são assim: *Hermetia illucens*,

*Musca domestica*, *Tenebrio molitor*, *Alphitobius diaperinus*, *Acheta domesticus*, *Gryllobes sigillatus* e *Gryllus assimilis*. Este regulamento também eliminou a exigência de que produtos de origem animal deveriam ser provenientes de um matadouro registrado, já que as instalações de criação de insetos não poderiam cumprir os requisitos específicos dos matadouros.

Pouco tempo depois a autorização estendeu-se as rações para animais de companhia.

Já em 2021, foi finalmente autorizada a incorporação de farinhas de insetos na alimentação de porco e galinhas (Figura 2).

A dinamização destas revisões e autorizações tem sido levada a cabo pela *International Platform of Insects for Food and Feed* (IPIFF), uma organização sem fins lucrativos da EU que representa os interesses do setor de produção de insetos para com os decisores políticos da EU, as partes interessadas europeias e os cidadãos. Composto por 54 membros, de 20 países, o IPIFF promove o uso de insetos para consumo humano e produtos derivados de insetos como uma fonte de nutrientes de primeira linha para a alimentação animal. Em 2019, foram produzidas cerca de seis mil toneladas de proteína de inseto pelos membros da IPIFF (IPIFF, 2019).

Apesar das restrições em 2019, o Regulamento (UE) n.º 2019/1981 introduziu uma lista de países terceiros autorizados a exportar produtos baseados em insetos, desde que a sua produção esteja realizada dentro das normas do referido Regulamento (UE) n.º 2017/893.

| Tipos de substratos  | Produção de insetos  | Espécies alvo   |  |  |   |
|--|--|---|--|--|---|
|  |  | Proteína  | Gordura  | Inseto vivo  | Inseto inteiro (seco ou congelado)  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Substratos vegetais</li> <li>✓ Restos alimentares: Vegetais, ovos, laticínios</li> <li>✗ Restos alimentares: Carne e peixe</li> <li>✗ Resto de refeições e produtos de matadouro</li> <li>✗ Estrume animal</li> </ul> |  <p>De acordo com IPIFF as espécies mais usadas são: <i>Tenebrio molitor</i>, <i>Hermetia illucens</i> e <i>Musca domestica</i></p> |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓</li> <li>✓</li> <li>✓*</li> <li>✓*</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓</li> <li>✓</li> <li>✓</li> <li>✓</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓</li> <li>✓</li> <li>✓</li> <li>✗</li> <li>✗</li> </ul> |

\*Permitido desde 7 de Setembro de 2021, em alguns estados membros da UE

**Figura 2-** Regras da EU atualmente aplicáveis para substratos e uso em alimentação animal (adaptado de IPFF, 2021)

Recentemente a comissão europeia aprovou o projeto de regulamento de aplicação que visa autorizar a comercialização de *A. domesticus* seco, moído e congelado e de *T. molitor* na forma de farinha, seco e congelado para o mercado da EU.

No entanto esta legislação da União Europeia encontra-se bastante restrita. Segundo a DG SANTE existem 2 barreiras legais que impedem a expansão deste setor e ambas se prendem com o tipo de substratos utilizados para alimentar os insetos. A primeira refere-se à proibição do uso de restos de alimentos que possam conter resíduos de carne ou peixe como matérias-primas para a alimentação de insetos. Em segundo lugar, não é permitido alimentar suínos e aves de capoeira com proteínas animais transformadas, com insetos na sua origem (DG SANTE, 2017). Contudo, países como os Países Baixos já demonstraram interesse e abordaram a EU na expectativa de acabar com estas restrições.

Apesar de progressos estarem a acontecer, o número de espécies de insetos permitidas corresponde a uma percentagem extremamente baixa em comparação com a elevada biodiversidade deste grupo de animais. Assim, havendo um grande número de espécies com potencial inexplorado ou subexplorado. Mesmo para as espécies já autorizadas somente se podem utilizar fontes de proteína processada em aquacultura, ignorando a utilização do inseto inteiro ou de lípidos obtidos a partir de insetos. Aumentar o número de espécies de insetos autorizados na alimentação animal poderia contribuir para uma melhoria da indústria, havendo a possibilidade de apresentarem vantagens inexistentes nas espécies já autorizadas. Alterações legislativas significativas relativas aos insetos são necessárias de forma a superar barreiras atuais e permitir ao crescimento da indústria.

### **1.5 Potencial das espécies de insetos**

Em anos recentes o número de estudos e o número de espécies estudadas para alimentação humana e animal tem aumentado significativamente na tentativa de perceber o potencial da sua produção em massa para consumo humano ou animal. Este potencial pode ser determinado por requisitos que incluam a duração ciclo de vida, sendo preferencialmente curto, uma alta taxa de fecundidade e a capacidade de reprodução de forma contínua num ambiente artificial (Mackauer, 1972). Estudos demonstraram que algumas espécies de Coleóptera, Ortóptera e Diptera apresentam um alto valor de proteína, semelhante à farinha de soja, embora inferior à farinha de peixe. No entanto, os dípteros poderiam surgir como alternativas à farinha de peixe já que exibem um perfil de aminos ácidos semelhante (Barroso et al., 2014).

*Hermetia illucens* L. (Diptera: Stratiomyidae), ou mosca soldado negro (BSF), tem vindo a receber grande atenção, quer pelos benefícios económicos, quer pelo potencial impacto positivo em questões ambientais (St-Hilaire et al., 2007; Marshall et al., 2015). Esta espécie é considerada a principal espécie de artrópode para a produção mundial de alimentos para animais e espera-se que a sua exploração continue a crescer no futuro (Tomberlin e van Huis, 2020). Assim como outras espécies, tem a capacidade de consumir matéria orgânica, onde se inclui estrume animal, desperdícios alimentares e outros resíduos orgânicos (Diener et al., 2001; Nguyen et al., 2015; Manurung et al., 2016). No estágio larvar pode reduzir

acumulações de matéria orgânica em 50%. Estes processos conseqüentemente levam ao aumento da biomassa dos indivíduos, sendo uma ótima fonte de proteína, de onde é possível formular uma série de produtos, podendo servir também como fonte de alimento para outras indústrias, como a pecuária e a aquacultura (Li et al., 2011; Zheng et al., 2012). Tendo este ponto em vista e pela facilidade de criação em ambiente controlado esta espécie é extremamente atrativa para os processos de industrialização em larga escala (Park et al., 2016), obtendo-se um produto de qualidade que não incorre em impactos ambientais nefastos, quando comparado as origens convencionais de proteína animal. Além disso, as larvas de BSF tornam a sua recolha acessível já que migram para fora do substrato húmido para locais mais secos (Banks et al., 2014; Rana et al., 2015).

Um estudo recente aponta *Machaerium maritima* (Haliday, 1832; Diptera: Dolichopodidae) como uma espécie com potencial para a aquacultura graças ao conteúdo em ómega-3 20% superior ao conteúdo encontrado nas espécies mais comuns como *H. illucens*. Aqui inclui-se também a presença do ácido eicosapentaenóico (EPA), essencial para o desenvolvimento saudável de organismos marinhos (Duarte et al., 2021).

As moscas varejeiras da família Calliphoridae (Diptera) possuem um grande potencial para serem usadas como ingredientes em ração para outros animais. Apesar de se tratar de uma família com aproximadamente 1000 espécies descritas ainda é um grupo pouco explorado, no que diz respeito às suas possíveis aplicações. (Kutty et al., 2010). Devido às suas elevadas taxas de fecundação, ciclos de vida curto, produzirem larvas de grandes dimensões, e o conhecimento sobre a sua criação em cativeiro, bem como, poderem ser produzidas com desperdícios orgânicos, tornam os membros desta família interessantes numa perspetiva de economia circular (Prado e Castro e Ameixa, 2021). Os seus valores em proteína (46-65%) mostram-se adequados tanto para peixes de água doce como de água salgada, que necessitam de 20-40% e 40-55%, de proteína bruta, respetivamente (Henry et al., 2015). Peixes de águas mais quentes geralmente necessitam de 10 a 20% de lípidos para possuírem taxas ótimas de crescimento, enquanto peixes carnívoros de água fria como os salmonídeos estão adaptados a níveis até 35% de lípidos nas suas dietas (Henry et al., 2015), sendo que as Calliphoridae apresentam cerca de cerca de 20 a 30% de lípidos. No entanto, à semelhança da maioria à das espécies de insetos terrestres, as Calliphoridae apresentam uma carência em EPA e DHA o que pode ser um fator limitante, sobretudo para a sua utilização em aquacultura. Todavia diversos membros desta família surgem naturalmente em cadáveres em decomposição de peixes, o que poderia contribuir para o desenvolvimento e melhoria do perfil nutricional (Aak et al., 2010, 2011), uma vez que o seu perfil pode ser modulado pela dieta (Finke e Oonincx, 2014)

## **1.6 Problemas de criação**

A criação de insetos tem-se desenvolvido na ótica da industrialização a larga escala, contudo o surgimento de pragas e doenças e do seu controlo e erradicação deverá ser levado em maior

consideração. O tipo de substrato utilizado, a matéria orgânica que é requerida poderá atrair outros artrópodes indesejados que poderão preda os insetos, alimentar-se da sua ração ou parasitá-los. Infestações nos locais de criação poderá levar a uma diminuição da performance dos insetos ou contaminar o produto final que irá para o mercado, algo que não seria aceite pelos órgãos responsáveis para qualidade do produto e bem-estar do consumidor (Reguzzi et al., 2021). Estes problemas poderão ser mitigados com o seguimento das diretrizes da IPIFF ou de literatura existente, embora haja uma carência neste âmbito (Berggren et al., 2018; IPIFF, 2020). A identificação das espécies de parasitoides é necessária para garantir a qualidade do controlo de pragas, bem como manter os indivíduos em condições ótimas. A título exemplificativo, pestes têm menor chance de colonizar locais de BSF se as larvas foram criadas em condições adequadas, já que lhes permite um crescimento acelerado, evitando competição, e boas taxas de reprodução (Reguzzi et al., 2021). Posto isto, o estudo das espécies hospedeiras e parasíticas poderia representar melhorias significativas nos sistemas de criação, limitando perdas e custos acrescidos.

### **1.7 Necessidade de otimização de metodologia**

Em comparação com outros sistemas de produção alimentar, ainda existem muitas preocupações causadas por lacunas de conhecimento na produção de insetos em componentes essenciais (Dobermann, 2017; van Huis, 2017), como a acumulação de pesticidas, agentes patogénicos ou metais de transição (van Huis et al., 2013; Henry et al., 2015).

Para que os insetos possam ser uma opção viável é essencial conseguir manter a sua produção em larga escala de forma segura, eficiente e sustentável (Dobermann et al., 2017). Enquanto os sistemas de produção de pecuária e agrícolas possuem níveis diferentes de automatização, este não é o caso das produções de insetos. Nestas o trabalho manual ainda é necessário para completar tarefas como a alimentação ou a recolha (Rumpold e Schluter, 2013), levando a um aumento dos custos de produção ainda que os custos de alimentação sejam baixos. O conhecimento da ecologia das espécies, de potenciais alimentos e necessidades de espaço recolhidas a partir da criação em pequena escala, como na criação para alimentação de animais de companhia, são importantes para o desenvolvimento de métodos em instalações de grande escala. Contudo grande parte desta informação é de difícil acesso devido à falta de publicações neste âmbito (Berggren et al., 2018).

A formulação de dietas artificiais tem permitido a produção em massa de insetos de forma mais simples, controlada e rentável quando comparado com a criação em dietas naturais. As dietas artificiais ideais podem, em última análise, servir como substitutos adequados para alimentos naturais. A aplicação de novas tecnologias, tais como a nutrigenómica e a nutrimetabolómica, em conjunto com o conhecimento da biologia dos insetos já permitiu avanços significativos na formulação de dietas. Estes resultaram numa melhor compreensão dos efeitos dos ingredientes sobre as funções fisiológicas e bioquímicas. A otimização das dietas levará a um maior controlo de qualidade e insetos mais saudáveis (Huynh et al., 2021).

## 1.8 Objetivos

Tendo em consideração o ponto atual da criação de insetos para a utilização, tanto em alimentação animal como humana, este trabalho tem como objetivo a otimização de alguns processos de criação de duas espécies distintas. *Calliphora vicina* ainda se trata de uma espécie com potencial por explorar, sendo que determinar a quantidade de alimento necessário para o seu desenvolvimento larvar poderá ser um primeiro passo para o desenvolvimento da sua criação com vista à alimentação. Por sua vez, *Hermetia illucens* já é uma espécie amplamente usada, no entanto as metodologias para a criação podem ser sempre aperfeiçoadas nomeadamente no que diz respeito à sua reprodução em ambiente controlado.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1 Organismos estudados

#### 2.1.1 *Calliphora vicina* (Diptera, Calliphoridae)

Esta espécie (Figura 3) tem recebido grande destaque pela sua aplicação em entomologia forense. A dimensão da larva encontra-se intrinsecamente relacionada com a sua idade em função do tempo e da temperatura. Assim, é possível determinar o tempo de colonização do cadáver e conseqüentemente o tempo de morte do mesmo (Donovan et al., 2016). Estas vivem numa grande variedade de habitats e a maioria das espécies, no estágio larvar alimenta-se de matéria orgânica em decomposição (Oosterbroek, 2006), sendo importantes agentes na reciclagem de nutrientes, possuindo assim grande importância ecológica (Prado e Castro *et al.*, 2012, 2016). Os ovos geralmente são depositados pelas fêmeas diretamente no substrato, onde eclodem em larvas do primeiro instar que crescem rapidamente e passam pelo segundo e terceiro instar, onde se alimentam. A temperaturas superiores a 15°C os ovos deverão eclodir após 24 horas e as larvas alimentam-se de imediato dos tecidos do corpo. Após migrarem do substrato as larvas passam a pupas. Instar no qual ocorre a metamorfose no individuo adulto (Greenberg, 1991; Hall, 2006). Assim como ocorre noutras espécies da ordem Diptera utilizadas para alimentação, as larvas de Calliphoridae no seu terceiro instar são provavelmente a melhor opção para serem utilizadas como ingredientes na alimentação animal usufruindo da sua migração do substrato, o que para facilita a sua recolha.



**Figura 3-** Indivíduo adulto de *C. vicina*

### **2.1.2 *Nasonia vitripennis* (Himenoptera, Pteromalidae)**

Ao longo do trabalho com *C. vicina* ocorreu um problema que afetou a integridade da colônia com o surgimento de um elevado número de parasitoides da espécie *Nasonia vitripennis* (Walker; Hymenoptera: Pteromalidae). *N. vitripennis* (Figura 4) é um parasitoide, que ataca pupas de várias espécies de dípteros, incluindo as famílias Calliphoridae e Muscidae. Esta espécie é um parasitoide gregário que poderá depositar até 60 ovos numa única pupa de Diptera (Whiting, 1967).



**Figura 4-** Indivíduo adulto de *N. vitripennis*

### **2.1.3 *Hermetia illucens* (Diptera, Stratiomyidae)**

*Hermetia illucens* é uma espécie de inseto que se encontra distribuída pelas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo (Hoc et al., 2019). A semelhança de outros insetos holometabólicos possui metamorfoses completas, passando pelos estádios de ovo, larva, pupa e adulto (Dzepe et al., 2021). As fêmeas de BSF apenas se reproduzem uma única vez durante todo o seu ciclo de vida (Giunti et al., 2018) Os ovos são depositados perto de matéria orgânica em decomposição e eclodem após 4 dias aproximadamente (Booth e Shepard, 1984). O crescimento e reprodução destes indivíduos são altamente influenciados pelas condições ambientais associadas, como a luz, temperatura e humidade. Apesar de conseguirem sobreviver num amplo espectro dentro das condições mencionados, as

condições ótimas para a criação deverão ser 27 °C e 70% de humidade relativa (RH) (Diener et al., 2009; Zhou et al., 2013). Assim em condições ótimas, após a eclosão do ovo, as larvas demorarão aproximadamente 14 dias até atingirem o estágio de pupa, demorando mais cerca de 14 dias até emergirem os adultos (Booth e Sheppard, 1984; Tomberlin e Sheppard, 2002). Os indivíduos de BSF acumulam a maioria dos nutrientes, ao longo dos instares larvares. No estado adulto podem ingerir alguns líquidos, por exemplo introduzir uma solução aquosa com açúcar pode dobrar o seu tempo de vida (Bruno et al., 2019). As pré-pupas são o instar larvar mais utilizado na alimentação animal. O seu teor em lípidos e proteínas podem representar cerca de 30–35% e 40–45% da sua massa total seca, respetivamente (Li et al., 2011; Zheng et al., 2012).



**Figura 5-** Indivíduo adulto de *H. illucens*

## **2.2 Desenho experimental**

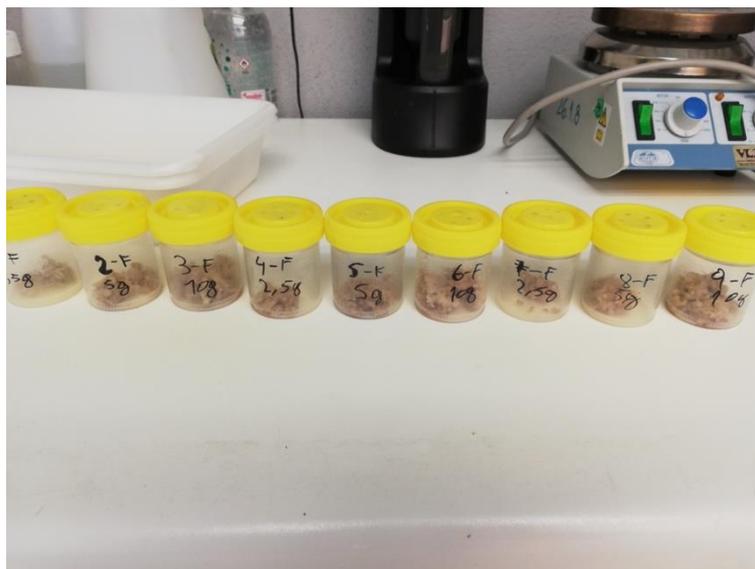
### **2.2.1 *C. vicina***

#### **2.2.1.1 Manutenção da colónia**

As *C. vicina* utilizadas neste estudo foram obtidas de uma colónia estabelecida na sala de criação de insetos no ECOMARE, Universidade de Aveiro, mantida com uma temperatura de 25°C, 40% de humidade relativa e um fotoperíodo de 16D:8N h. Os adultos, foram mantidas em gaiolas de volume 60x40x40 cm, com acesso a água com açúcar através de um frasco com água invertido colocado sob um papel filtro colocado numa placa de petri onde foi adicionado açúcar refinado. Pequenos recipientes com porções de fígado de porco foram oferecidos em dias alternados como substrato de postura para manutenção da cultura. A cada 2 dias o fígado é mudado e o papel de filtro e a água são renovados. Os recipientes com o fígado com os ovos foram recolhidos e foram colocados num recipiente aberto com areia no fundo. A estes foi adicionado carne picada para as larvas se alimentarem após a eclosão até migrarem do substrato para puparem na areia. As pupas foram recolhidas e colocadas numa gaiola até emergirem, repetindo todo o ciclo de vida.

### 2.2.1.2 Teste de alimentação

De forma a estabelecer a quantidade de alimento ótima necessária para que uma larva atinja a fase de pupa, evitando assim uma alimentação sub-ótima ou o desperdício de substratos através da sobrealimentação, foi realizado um ensaio onde se testou diferentes quantidades iniciais de substrato (carne picada de porco). Testaram-se 0,25, 0,5 e 1 grama de substrato inicial por larva. Para cada uma destas quantidades iniciais de carne picada foram realizadas 3 réplicas, um total de 9 amostras (Figura 6).



**Figura 6-** Frascos com 2,5g; 5g e 10g divididos por 3 réplicas com 10 larvas de *C. vicina* por frasco

Em cada uma das amostras foram colocadas 10 larvas e para cada três frascos foi atribuída 2,5; 5; e 10 gramas de substrato. Devido ao facto de o período de eclosão dos ovos ser curto, um pedaço de fígado foi preparado na véspera do teste, para as fêmeas depositarem nele os seus ovos. Desta forma foi possível encurtar o tempo em que as larvas se poderiam alimentar do fígado, reduzindo a margem de erro que poderia ser associada. As amostras foram mantidas em frascos com pequenos orifícios nas tampas. A cada dia era adicionada água com um pulverizador numa tentativa de diminuir a secura dos substratos ao longo da duração dos ensaios.

Nos 7 dias seguintes, com exceção do primeiro dia, as larvas e o substrato foram separados e pesados individualmente, permitindo avaliar o seu crescimento ao longo da semana. No primeiro dia após as preparações, as pesagens não foram efetuadas devido à ao facto de esta ser impraticável pequena dimensão das larvas.

O desempenho das larvas nos diferentes ensaios foi obtido pela análise dos seguintes parâmetros, descritos em Diener et al., 2009; Banks, 2014:

**Taxa de redução de substrato:**

$$\frac{\text{Total de substrato adicionado} - \text{Total de substrato após tratamento}}{\text{Total de substrato adicionado}} \times 100$$

**Taxa de conversão de alimento:**

$$\frac{\text{Total de substrato adicionado}}{\text{Total de biomassa prepupa}}$$

**Taxa de bioconversão:**

$$\frac{\text{Total de biomassa prepupa}}{\text{Total de substrato adicionado}} \times 100$$

**2.2.1.3 Análise estatística**

De forma avaliar as diferenças no peso final das larvas consoante a quantidade de substrato inicial fornecido em cada tratamento foi realizada uma análise de variância a 1 fator (ANOVA) para identificar diferenças estatisticamente significativas. O nível de significância foi estabelecido com  $p < 0,05$ . Os testes foram realizados utilizando o software SPSS, versão 28.0.0.0 (190). Esta análise também foi efetuada para verificar as diferenças entre as taxas de redução de substrato, de conversão de alimento e de bioconversão.

**2.2.1.4 Controlo e taxas de parasitismo na população de *C. vicina***

Inicialmente foi realizada uma tentativa de erradicação dos parasitoides mudando os adultos para gaiolas que não contivessem parasitoides. Contudo este método mostrou-se ineficaz já que não foi possível recolher os adultos sem garantias de que alguns parasitoides estavam presentes. Após identificada a espécie de parasitoide e recolher informações sobre o seu ciclo de vida foi possível chegar a um método mais eficaz para erradicar os parasitoides. Assim, e porque os parasitoides atacavam as pupas das moscas, após as larvas migrarem, as pupas foram recolhidas e colocadas individualmente em microtubos ao longo de vários dias. Estes foram fechados com um pedaço de algodão de forma a impedir que os parasitoides escapassem, mas permitindo a entrada de oxigénio (Figura 7).



Figura 7- Microtubo onde as pupas foram isoladas para o teste de parasitismo

Após isto registou-se, diariamente, o número de adultos de *C. vicina*, de pupas parasitadas, de parasitoides por pupa e a mortalidade da espécie da mosca. Por fim, foram calculadas:

**Taxa de parasitismo** (Adaptada de Sule et al., 2014):

$$\frac{\text{número de pupas parasitadas}}{\text{número de pupas parasitadas} + \text{número de indivíduos adultos}} \times 100$$

**Taxa de mortalidade:**

$$\frac{\text{número de indivíduos mortos}}{\text{número de indivíduos mortos} + \text{número de indivíduos}} \times 100$$

## 2.2.2 *H. illucens*

### 2.2.2.1 Manutenção da colónia

As moscas utilizadas neste estudo foram obtidas de uma colónia instalada na sala de criação de insetos no ECOMARE, Universidade de Aveiro, que é mantida durante todo o ano desde 2018, numa dieta de controlo composta por ração para pintos e água da torneira (1:1, v/v) e mantidos sob fotoperíodo de 16D:8N h, com humidade relativa de 40±5% e temperatura de 27±3°C. A colónia possui duas áreas distintas, um insectário onde ocorre a reprodução dos indivíduos adultos e onde as fêmeas realizam a oviposição, e uma área de larvário onde são colocados os ovos recolhidos das gaiolas e onde as larvas passam pelos diversos instares

larvares até chegarem à fase de prepupa, altura em que migram do substrato para puparem. As pupas são recolhidas desta área e colocadas de novo numa gaiola do insectário.

#### **2.2.2.2 Teste de oviposição**

De forma a avaliar os efeitos que a luz incidente tem sobre a reprodução dos indivíduos de BSF foi testada a oviposição das fêmeas com 2 tipos de lâmpadas distintas, i) iluminação LED “branco frio” e CCT (Temperatura de cor correlacionada) 6400K (LED1); ii) iluminação LED com o espectro no intervalo entre azul e vermelho (22% azul; 36% verde; 38% vermelho) e CCT de 4800K (LED2).

De forma a testar os dois tipos de iluminação sem interferência de outras fontes de luz, cobriram-se duas prateleiras com uma lona preta. Como garantia de que a luz do insectário não tivesse influência sobre os adultos, as gaiolas foram isoladas com uma lona de polietileno preto e opaco. Pupas da produção regular do insectário foram recolhidas e colocadas em uma gaiola dos dois tipos de iluminação. Uma vez que a eclosão de machos e fêmeas não ocorre ao mesmo tempo, esperou-se 48 horas após a eclosão dos primeiros adultos para separar 20 machos e 20 fêmeas que posteriormente foram e colocados numa gaiola. Nas gaiolas onde foram colocados os 40 adultos foram também colocadas 2 tábuas de madeira unidas com um elástico para as fêmeas colocarem os seus ovos. Após 2 dias as tabuas eram removidas e inspeccionadas para verificar a existência de ovos. Sempre que posturas de ovos foram encontradas estas foram fotografadas numa câmara fotográfica acoplada a um estereomicroscópio com o auxílio de 2 programas (LAS EZ e Toupview). Os ovos foram fotografados de forma a permitir a contagem dos mesmos e do número de posturas. Quando possível os ovos de cada postura eram contados isoladamente, contudo no caso posturas sobrepostas isto não era possível. Nesta situação contou-se o número de ovos na camada superior e a partir daí estimou-se que o número de ovos não visíveis seria semelhante aos contados, na tentativa de chegar a um valor mais próximo da realidade.

#### **2.2.2.3 Análise estatística**

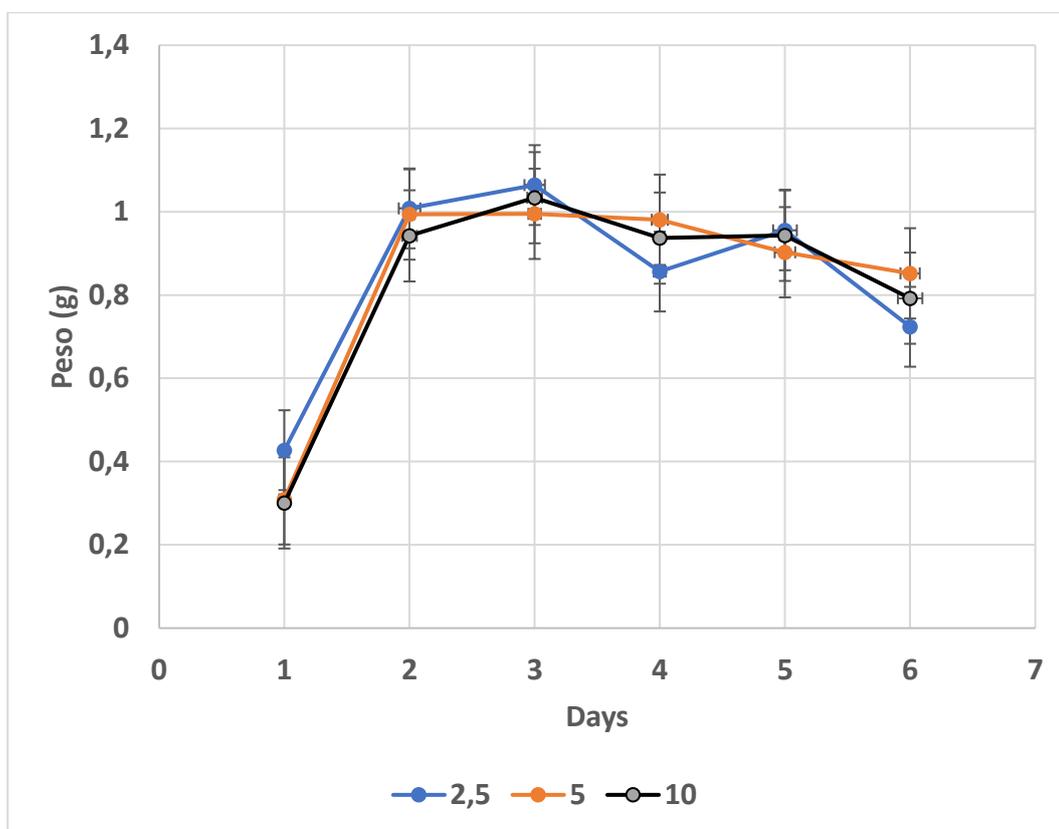
De forma a avaliar as performances de oviposição das fêmeas expostas a diferentes lâmpadas foram realizados testes não-paramétricos de Mann-Whitney com auxílio do software SPSS, versão 28.0.0.0 (190). Assim pretendeu-se perceber a existência de diferenças significativas entre o número total de ovos, o número de grupos, o número de ovos por fêmea e o número de ovos por grupos.

### 3. Resultados

#### 3.1 *C. vicina*

##### 3.1.1 Testes de alimentação

No gráfico abaixo (Figura 3) é possível observar um comportamento semelhante no ganho de peso nas larvas alimentadas com 3 diferentes quantidades iniciais de substrato. O ganho de peso é mais evidente nos dois primeiros dias nos 3 tratamentos, atingindo um pico no terceiro dia. Até ao sexto e último dia de pesagens, verificou-se uma tendência para uma ligeira perda de peso até terminar o ensaio.



**Figura 8-** Variação do peso das larvas de *C. vicina* ao longo do tempo em função da quantidade de alimento inicial (2,5g; 5g; 10g). Valores são médias de 3 réplicas  $\pm$  erro padrão.

Da comparação entre as 3 quantidades iniciais de substrato testadas não se verificaram diferenças significativas no peso final de acordo como os resultados da ANOVA a 1 fator ( $p = 0,893$ ).

**Tabela 1-** Valor dos parâmetros taxa de conversão, taxa de bioconversão e taxa de redução de substrato (média  $\pm$  Desvio padrão;  $n=3$ ;  $p>0,05$ ), para as larvas de *C. vicina* alimentados

com diferentes quantidades de substrato. Letras diferentes representam diferenças significativas

| Parâmetros                       | Quantidade de substrato |              |               |
|----------------------------------|-------------------------|--------------|---------------|
|                                  | 0,25 g/larva            | 0,5 g/larva  | 1 g/larva     |
| Taxa de redução de substrato (%) | 19,92a ± 5,15           | 1,52a ± 6,89 | 4,54a ± 4,94  |
| Taxa de conversão de alimentos   | 3,46a ± 0,21            | 5,96a ± 1,03 | 12,99a ± 2,68 |
| Taxa de bioconversão (%)         | 28,97a ± 1,63           | 16,99a ± 70  | 7,93b ± 1,69  |

Da comparação entre as 3 quantidades de substrato não se verificaram diferenças significativas para a taxa de redução de substrato e para a taxa de conversão de alimento. Já para a taxa de bioconversão o substrato de 1 g/larva é significativamente diferente de 0,25 e 0,5 g/larva de acordo como os resultados da ANOVA a 1 fator.

### 3.1.2 Taxas de parasitismo na população de *C. vicina*

Ao longo de aproximadamente duas semanas observou-se a população de Calliphoridae e contabilizaram-se as taxas de parasitismo por *N. vitripennis* diariamente. A taxa de parasitismo foi calculada como a razão entre o número de pupas parasitadas e o número total pupas.

Em média cerca de 25.5 pupas de *C. vicina* estavam parasitadas a cada dois dias. Em média de cada pupa emergiram cerca 9 parasitoides. Ao longo de 16 dias emergiram das pupas de *C. vicina* em média 278 parasitoides.

As médias de parasitoides por cada pupa mostram-se relativamente próximas, com a exceção de dia 6 e de dia 18, onde nenhuma pupa foi parasitada e apenas 1 foi parasitada por 20 indivíduos, respetivamente. Contudo o número de pupas parasitadas e o número total de parasitoides demonstram uma amplitude maior de valores. Por fim, temos os valores referentes ao número de pupas onde nem o individuo adulto, nem parasitoides surgiram, contabilizando assim para a taxa de mortalidade. Aplicando as fórmulas acima descritas obteu-se uma taxa de parasitismo de 38,13% e uma taxa de mortalidade 23,91%.

**Tabela 2-** Dados relativos à população do parasitoide (*N. vitripennis*)

| Data  | nº total de adultos de <i>C. vicina</i> | nº de total de pupas parasitadas | nº de total de parasitoides | Nº médio de parasitoides por pupa | Adultos de <i>C. vicina</i> não emergiram |
|-------|---|----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|---|
| 02/05 | 23                                      | 33                               | 380                         | 8,0                               | 25  |
| 04/05 | 62                                      | 39                               | 333                         | 7,5                               | 0   |
| 06/05 | 7                                       | 0                                | 0                           | 0                                 | 0   |
| 09/05 | 33                                      | 68                               | 810                         | 8,5                               | 12  |
| 11/05 | 74                                      | 27                               | 318                         | 9,5                               | 22  |

|       |      |      |     |      |    |
|-------|------|------|-----|------|----|
| 13/05 | 44   | 21   | 203 | 8,0  | 18 |
| 16/05 | 56   | 15   | 160 | 8,0  | 16 |
| 18/05 | 32   | 1    | 20  | 20,0 | 11 |
| Média | 41,4 | 25,5 | 278 | 8,7  | 13 |

### 3.2 Teste de oviposição *H. illucens*

Ao longo de cerca de dois meses foi recolhida informação sobre o número de ovos, números de grupo de ovos, à unidade e ao peso em gramas (Tabela 3).

Registaram-se diferenças significativas para o número de ovos ( $U=230.000$ ,  $P=0,006$ ), para o número de grupos de ovos ( $U=265.500$ ,  $P=0,030$ ) e para o número de ovos por fêmea ( $U=230.000$ ,  $P=0,006$ ). Contudo essas diferenças não se verificaram para o número de ovos por grupo ( $U=286.000$ ,  $P=0,72$ ).

**Tabela 3-** Dados relativos à oviposição de *H. illucens* sob dois tipos lâmpadas com diferentes espectros

|                         | Tipo de iluminação |              |                      |            |              |                      |
|-------------------------|--------------------|--------------|----------------------|------------|--------------|----------------------|
|                         | LED1               |              |                      | LED2       |              |                      |
|                         | nº de ovos         | Peso ovos(g) | nº de grupos de ovos | nº de ovos | Peso ovos(g) | nº de grupos de ovos |
| <i>dia 1</i>            | 345                | 0,012        | 1                    | 0          | 0,000        | 0                    |
| <i>dia 2</i>            | 927                | 0,033        | 6                    | 219        | 0,008        | 2                    |
| <i>dia 3</i>            | 824                | 0,030        | 5                    | 307        | 0,011        | 2                    |
| <i>dia 4</i>            | 1164               | 0,042        | 8                    | 132        | 0,005        | 1                    |
| <i>dia 5</i>            | 920                | 0,033        | 8                    | 182        | 0,007        | 2                    |
| <i>dia 6</i>            | 259                | 0,009        | 1                    | 59         | 0,002        | 1                    |
| <i>dia 7</i>            | 669                | 0,024        | 4                    | 451        | 0,016        | 3                    |
| <i>dia 8</i>            | 389                | 0,014        | 1                    | 0          | 0,000        | 0                    |
| <i>dia 9</i>            | 433                | 0,016        | 3                    | 127        | 0,005        | 2                    |
| <i>dia 10</i>           | 212                | 0,008        | 1                    | 0          | 0,000        | 0                    |
| <i>dia 11</i>           | 464                | 0,017        | 3                    | 137        | 0,005        | 1                    |
| <i>dia 12</i>           | 505                | 0,018        | 3                    | 173        | 0,006        | 1                    |
| <i>dia 13</i>           | 729                | 0,026        | 4                    | 203        | 0,007        | 1                    |
| <i>dia 14</i>           | 558                | 0,020        | 5                    | 221        | 0,008        | 2                    |
| <i>dia 15</i>           | 691                | 0,025        | 5                    | 90         | 0,003        | 1                    |
| <i>dia 16</i>           | 479                | 0,017        | 3                    | 276        | 0,010        | 1                    |
| <i>dia 17</i>           | 494                | 0,018        | 3                    | 379        | 0,014        | 2                    |
| <i>dia 18</i>           | 383                | 0,014        | 2                    | 136        | 0,005        | 1                    |
| <i>Média ovos/fêmea</i> | 24,98              | 0,0009       |                      | 9,10       | 0,0003       |                      |
| <i>Média ovos/grupo</i> | 164,7              | 0,0059       |                      | 136,00     | 0,0049       |                      |

## 4. Discussão

### 4.1 *C. vicina*

Para otimizar a produção de *C. vicina* de forma a obter a maior quantidade possível de biomassa, é importante compreender as necessidades de alimento por parte das larvas. As diferentes quantidades de substrato adicionado para os grupos de 10 larvas foram utilizadas como forma de determinar a exigência alimentar das larvas até ao início do estágio de pupa. Restringir a porção de alimento atribuído a larvas de *C. vicina* permitirá evitar a carência ou excesso de alimento, assim evitando larvas subnutridas ou desperdício alimentar. Face aos resultados obtidos, entre nenhuma das quantidades de substrato conferida surgem diferenças significativas em relação ao desenvolvimento e peso final das larvas. Assim as quantidades menores de alimento adicionado mostram-se igualmente eficientes para o desenvolvimento larvar, mas com um aproveitamento maior do substrato já que a quantidade que se encontra em excesso é inferior.

Na Tabela 1 estão representados os valores da taxa de redução de substrato, de conversão de alimento e de bioconversão e para as larvas de *C. vicina* alimentados com diferentes quantidades de substrato. Quer para a taxa de redução de substrato, quer para a conversão de substrato, apesar dos valores se mostrarem distintos a análise estatística mostra que essas diferenças não são significativas para nenhuma das quantidades de alimento adicionado. Em relação à taxa de bioconversão, ou seja, a quantidade de biomassa de larva produzida por unidade de substrato, verificou-se não haver diferenças significativas entre 0,25g e 0,5g, mas estas ocorreram para 1 g/larva. Isto demonstra que as larvas que encontraram disponíveis menores quantidades de substrato foram as mais eficientes em converter o em biomassa.

Estudos anteriores com *C. vicina* utilizaram 3 gramas por larva (Kaneshrajah e Turner, 2004). Embora estivessem a determinar que tipo de substrato seria mais eficaz para o desenvolvimento larvar é possível verificar um comportamento semelhante na aquisição de peso por parte das larvas em todos os substratos, tanto para Kaneshrajah e Turner (2004), como para o presente trabalho. Contudo, as larvas em Kaneshrajah e Turner (2004) atingiram o seu pico mais tarde, sendo no sexto dia, enquanto anteriormente percebeu-se que nas quantidades inferiores o pico foi atingido ao terceiro dia (figura 3). No entanto, este pico é ligeiramente superior quando 3 gramas de substrato estavam atribuídas a uma larva.

Na tentativa de determinar o melhor índice de sobrevivência e fecundação de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819; Diptera: Calliphoridae), Godoy et al. (2001) concluíram que a proporção de 1 grama por larva seria a mais eficiente para estes parâmetros. À luz destes resultados, Estrada et al. (2009) testaram uma variedade de dietas com diferentes tecidos corporais de origem bovina como fonte de alimento. A dieta de controlo usada consistia em apenas carne picada, enquanto as restantes variaram na proporção entre água e carne. Neste trabalho as larvas alimentadas demonstram um comportamento semelhante às do presente estudo (Figura 3), embora tenham atingido seu pico de biomassa alguns dias mais tarde. Em 1990, Parra (1990) destacou aspetos físicos das rações, como a textura, homogeneização e teor em água, como fatores de elevada importância para a formulação destas.

De forma a determinar a percentagem de redução de substrato e a taxa de bioconversão, Banks et al. (2014) alimentaram larvas de BSF com fezes frescas a cada dois dias ou uma quantidade grande de fezes que deverá durar até ao final do ensaio. Comparando os

resultados obtidos com os do presente trabalho os indivíduos de *H. illucens* apresentam uma taxa de conversão consideravelmente mais eficiente do que *C. vicina*. Contudo, no que diz respeito à bioconversão, *C. vicina* apresenta taxas mais altas, especialmente nas larvas alimentadas com uma proporção de 0,25 g/larva.

#### **4.2 *H. illucens***

As moscas *H. illucens* à semelhança de muitos insetos possuem fototropismo, ou seja, voam em direção à luz. Os machos de BSF dependem da luz solar para detetar as fêmeas e por isso muitos autores acreditavam ser desafiante tentar induzir a reprodução da espécie em ambiente fechado (Tomberlin e Sheppard, 2002). Contudo, Nakamura et al., (2016) demonstraram que é possível. Embora ocorra reprodução por parte dos adultos de BSF utilizando lâmpadas LED (400–800 nm) (Nakamura et al., 2016) e Lâmpadas de halogéneo (350–2500 nm) (Zhang et al., 2010), nenhum comportamento reprodutivo foi verificado com lâmpadas de terras raras (350–450 nm) (Sheppard et al., 2002) ou sistemas como Sylvania Gro Lux system (400–680 nm) (Tomberlin e Sheppard, 2002). Oonincx et al. (2016) concluiu que o comprimento de onda no intervalo entre 332nm a 535nm influencia positivamente a reprodução.

Devido à estrutura dos olhos os indivíduos de *H. illucens* que possuem uma elevada sensibilidade para comprimentos de onda mais curtos no espectro de luz. De modo de forma a garantir a eficiência, a luz gerada pelo sistema de iluminação deverá estar compreendida entre o UV e o azul (Oonincx et al., 2016). No presente trabalho, das duas lâmpadas LED testadas a que obteve maior eficiência na oviposição foi LED1. Comparando as especificações das lâmpadas testadas verificou-se que LED1 aproxima-se mais do espectro de luz ótimo para o sucesso da reprodução.

Uma hipótese levantada por Nakamura et al. (2016) sugeria que a densidade de indivíduos seria um fator essencial para que os adultos se reproduzissem, usando 50 machos e 50 fêmeas por gaiola. Contudo, no presente trabalho, foram colocados dentro das gaiolas 20 fêmeas e 20 machos, com bons resultados na reprodução e na oviposição. Da mesma forma no trabalho de Heussler et al. (2018), as densidades de BSF nas gaiolas foram de 60 e 80 indivíduos, divididos igualmente entre machos e fêmeas, sem nenhuma diferença significativa registada. Já Oonincx et al., (2016), utilizaram apenas 10 fêmeas e 10 machos sem que a oviposição fosse influenciada negativamente.

No trabalho de Heussler et al. (2018) indivíduos adultos de *H. illucens* foram expostos a 3 lâmpadas diferentes sendo estas LED, fluorescentes e de halogéneo. Comparando os resultados obtidos com os do presente trabalho é possível verificar que o total de ovos, em gramas, foi superior para as 3 lâmpadas em relação aos dois LEDs usados. Contudo, o valor médio de pesos dos grupos de ovos foi superior nas lâmpadas LEDs. Isto poderá significar que o número de fêmeas a colocar ovos foi significativamente menor, enquanto as que colocam ovos depositam uma maior quantidade deles numa oviposição.

## **5. Conclusão**

Apesar da necessidade urgente de encontrar e desenvolver o conhecimento sobre as fontes de proteína alternativas ainda existem muitos detalhes específicos na ecologia de cada espécie que condicionam a produção de insetos à escala industrial.

A manutenção das espécies de insetos em cativeiro há semelhanças de qualquer produção pecuária está sujeita ao aparecimento de pragas e doenças que podem pôr em causa toda a produção. A recolha de insetos no estado selvagem deve obedecer a um conjunto de procedimentos para evitar o transporte de parasitoides.

Em suma com este trabalho é possível entender que os insetos possuem potencial para substituir, ou pelo menos complementar as rações usadas habitualmente para animais criados em cativeiro. Embora progressos estejam a acontecer no que toca à legislação e conhecimento da biologia das espécies ainda há muitas lacunas a preencher. Apesar de algumas espécies estarem bem estudadas este número encontram-se ainda distante do que seria ideal, e do que a ordem Insecta poderia oferecer. A informação que contribuiria para a criação de muitas espécies ainda é escassa ou inexistente, havendo espaço para futuros estudos e espécies com o potencial a ser trabalhado. Para a indústria se desenvolver de forma adequada os processos de criação necessitam de ser otimizados e legislação deverá permitir que novas espécies sejam comercializadas.

## 6. Referências bibliográficas

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. In Sustainability in Action; FAO: Rome, Italy, 2020.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2013. Edible insects. Prospects for food and feed security. Food and Agriculture Organization of the United Nations (Vol. 171, pp. 1–201)

Alexandratos, N. and J. Bruinsma. 2012. World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision. ESA Working paper No. 12-03. Rome, FAO.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2011. World Livestock 2011 – Livestock in Food Security.

Sánchez-Muros, M.J., Barroso, F.G. and Manzano-Agugliaro, F., 2014. Insect meal as renewable source of food for animal feeding: a review. *Journal of Cleaner Production* 65: 16–27. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.11.068>

Barragan-Fonseca KB, Dicke M, van Loon JJ (2017) Nutritional value of the black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) and its suitability as animal feed—a review. *J Insects as Food Feed* 3:105–120. <https://doi.org/10.3920/JIFF2016.0055>

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). FAOSTAT Online Database, FAO, Rome, Italy, 2018

Makkar HPS, Tran G, Heuzé V, Ankers P. State-of-the-art use of insects as animal feed. *Animal Feed Science and Technology*. 2014; 197:1-33 R. Lal, Climate change and agriculture, *Clim. Chang.* (2021) 661–686, <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-821575-3.00031-1>.

C. Dalin, Sustainability of groundwater used in agricultural production and trade worldwide, *Glob. Gr. Wat.* (2021) 347–357, <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818172-0.00025-6>.

J. Pirker, A. Mosnier, F. Kraxner, P. Havlík, M. Obersteiner, What are the limits to oil palm expansion? *Glob. Environ. Chang.* 40 (2016) 73–81, <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2016.06.007>.

Lotze, H.K., Lenihan, H.S., Bourque, B.J., Bradbury, R.H., Cooke, R.G., Kay, M.C., Kidwell, S.M., Kirby, M.X., Peterson, C.H., Jackson, J.B.C. (2006) Depletion, degradation, and recovery potential of estuaries and coastal seas. *Science* 312, 1806-1809

Worm, B., Barbier, E.B., Beaumont, N., Duffy, J.E., Folke, C., Halpern, B.S., Jackson, J.B.C., Lotze, H.K., Micheli, F., Palumbi, S.R., Sala, E., Selkoe, K.A., Stachowicz, J.J., Watson, R. (2006) Impacts of Biodiversity Loss on Ocean Ecosystem Services. *Science* 314: 787-760.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2011. Review of the State of World Marine Fishery Resources. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 569. FAO, Rome: 334 p.

Draaisma, R.B., Wijffels, R.H., Slegers, P.M., Brentner, L.B., Roy, A., Barbosa, M.J., 2013. Food commodities from microalgae. *Curr. Opin. Biotechnol.* 24, 169–177. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.09.012>.

Khan S, Naz S, Sultan A, Alhidary IA, Abdelrahman MM, Khan RU, et al. Worm meal: A potential source of alternative protein in poultry feed. *World's Poultry Science Journal.* 2016;72(01):93-102)

Tacon AGJ (1993) Feed ingredients for warm water fish: fish meal and other processed feedstuffs. FAO Fisheries Circular (FAO). no. 856. FAO, Rome, 64p.

Fang X, Yu D, Buentello A et al (2016) Evaluation of new non-genetically modified soybean varieties as ingredients in practical diets for *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 451:178–185. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.08.026>

Mosberian-Tanha, P., Landsverk, T., Press, C. M., Mydland, L. T., Schrama, J. W., & Øverland, M. (2017). Granulomatous enteritis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) associated with soya bean meal regardless of water dissolved oxygen level. *Journal of Fish Diseases*, 41(2), 269–280. doi:10.1111/jfd.12710

da Silva VP, van der Werf HM, Spies A, Soares SR (2010) Variability in environmental impacts of Brazilian soybean according to crop production and transport scenarios. *J Environ Manag* 91:1831–1839

Mitchell D (2008) A note on rising food prices. World Bank, Washington, DC

Garg M, Sharma N, Sharma S, Kapoor P, Kumar A, Chunduri V, Arora P. Biofortified crops generated by breeding, agronomy, and transgenic approaches are improving lives of millions of people around the world. *Front Nutr* 2018;5:12.

Hirschi KD. Nutrient biofortification of food crops. In: Cousins R, Bier D, Bowman B, Dean L, editors. *Annual review of nutrition.* 2009/04/28 ed. Palo Alto (CA): Annual Reviews, Inc.; 2009. pp. 401–21.

Bryan Delaney, Richard E Goodman, Gregory S Ladics, Food and Feed Safety of Genetically Engineered Food Crops, *Toxicological Sciences*, Volume 162, Issue 2, April 2018, Pages 361–371, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx249>

Becker EW. 2004. Microalgae in human and animal nutrition. In: Richmond A, editor. *Handbook of microalgal culture.* Oxford: Blackwell. p 312–51.

Wells ML, Potin P, Craigie JS et al (2017) Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. *J Appl Phycol* 29:949–982. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0974-5>

Ameixa, O.M.C.C., Duarte, P.M., Rodrigues, D.P. (2020). Insects, Food Security and Sustainable Aquaculture. In: Leal Filho, W., Azul, A., Brandli, L., Özuyar, P., Wall, T. (eds) Zero Hunger. Encyclopedia of the UN Sustainable Development Goals. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-69626-3\\_111-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-69626-3_111-1)

Jones, S. W., Karpol, A., Friedman, S., Maru, B. T., & Tracy, B. P. (2020). Recent advances in single cell protein use as a feed ingredient in aquaculture. *Current opinion in biotechnology*, 61, 189–197. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.12.026>

K.K. Lum, J. Kim, X. Lei, Dual potential of microalgae as a sustainable biofuel feedstock and animal feed, *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 4 (1) (2013) 53, <https://doi.org/10.1186/2049-1891-4-53>.

D.F. Correa, H.L. Beyer, H.P. Possingham, J. García-Ulloa, J. Ghazoul, P. M. Schenk, Freeing land from biofuel production through microalgal cultivation in the neotropical region, *Environ. Res. Lett.* 15 (9) (2020), 094094, <https://doi.org/10.1088/1748-9326/ab8d7f>

Z. Xue, Y. Yu, W. Yu, X. Gao, Y. Zhang, X. Kou, Development prospect and preparation technology of edible oil from microalgae, *Front. Mar. Sci.* (2020) 7, <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00402>.

Torres-Tiji, Y., Fields, F. J., & Mayfield, S. P. (2020). Microalgae as a future food source. *Biotechnology advances*, 41, 107536. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107536>

M.S. Madeira, C. Cardoso, P.A. Lopes, D. Coelho, C. Afonso, N.M. Bandarra, J.A. M. Prates, Microalgae as feed ingredients for livestock production and meat quality: a review, *Livest. Sci.* 205 (2017) 111–121, <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2017.09.020>.

V.H. Smith, B.S.M. Sturm, F.J. deNoyelles, S.A. Billings, The ecology of algal biodiesel production, *Trends Ecol. Evol.* 25 (5) (2010) 301–309, <https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.11.007>.

O. Cheregi, S. Ekendahl, J. Englebretsson, N. Strömberg, A. Godhe, C. Spetea, Microalgae biotechnology in nordic countries – the potential of local strains, *Physiol. Plant.* 166 (1) (2019) 438–450, <https://doi.org/10.1111/ppl.12951>.

Ritala, A., Häkkinen, S. T., Toivari, M., & Wiebe, M. G. (2017). Single Cell Protein-State-of-the-Art, Industrial Landscape and Patents 2001-2016. *Frontiers in microbiology*, 8, 2009. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02009>

Anupama, and Ravindra, P. (2000). Value-added food: single cell protein. *Biotechnol. Adv.* 18, 459–479. doi: 10.1016/S0734-9750(00)00045-8

Schulz, E., and Oslage, H. J. (1976). Composition and nutritive value of single-cell protein (SCP). *Anim. Feed Sci. Technol.* 1, 9–24. doi: 10.1016/0377-8401(76)90003-1

Strong, P. J., Xie, S., and Clarke, W. P. (2015). Methane as a resource: can the methanotrophs add value? *Environ. Sci. Technol.* 49, 4001–4018. doi: 10.1021/es504242n

Collavo, A., Glew, R.H., Huang, Y.S., Chuang, L.T., Bosse, R., Paoletti, M.G., 2005. House cricket small-scale farming. In: Paoletti, M.G. (Ed.), *Ecological Implications of Minilivestock: Potential of Insects, Rodents, Frogs and Snails*. Science Publishers, New Hampshire, pp. 519–544.

de Vries, M., & de Boer, I. J. M. (2010, March). Comparing environmental impacts for livestock products: A review of life cycle assessments. *Livestock Science*. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2009.11.007>

Oonincx, D. G. A. B., van Itterbeeck, J., Heetkamp, M. J. W., van den Brand, H., van Loon, J. J. A., & van Huis, A. (2010). An exploration on greenhouse gas and ammonia production by insect species suitable for animal or human consumption. *PLoS ONE*, 5(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014445>

Yang Y, Yang J, Wu W, Zhao J, Song Y, Gao L, et al. Biodegradation and mineralization of polystyrene by plastic-eating mealworms: Part 1. Chemical and physical characterization and isotopic tests. *Environmental Science and Technology*. 2015;49(1):12080-12086

Directorate-General for Health and Food Safety (DG SANTE), 2017. Strategic safety concept for insects as feed, updated. DG SANTE, Brussels, Belgium. Available at: [https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/animal\\_feed\\_marketing\\_concept-paper\\_insects\\_201703.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/animal_feed_marketing_concept-paper_insects_201703.pdf).

Mackauer, M. Genetic aspects of insect production. *Entomophaga* 1972, 17, 27–48.

St-Hilaire S, Cranfill K, McGuire MA, Mosley EE, Tomberlin JK, Newton L, et al. Fish offal recycling by the black soldier fly produces a foodstuff high in Omega-3 fatty acids. *J World Aquacult Soc*. 2007; 38: 309–313.

Marshall, S. A., N.E. Woodley and M. Hauser, 2015. The historical spread of the lack soldier fly, *Hermetia illucens* (L.) (Diptera, Stratiomyidae, Hermetiinae), and its establishment in Canada. *J. ent. Soc. Ont.*, 146: 51-54.

Tomberlin, J.K. and Van Huis, A., 2020. Black soldier fly from pest to ‘crown jewel’ of the insects as feed industry: an historical perspective. *Journal of Insects as Food and Feed* 6: 1-4. <https://doi.org/10.3920/JIFF2020.0003>

Barroso, F.G.; de Haro, C.; Sánchez-Muros, M.J.; Venegas, E.; Martínez-Sánchez, A.; Pérez-Bañón, C. The potential of various insect species for use as food for fish. *Aquaculture* 2014, 422, 193–201.

Diener S, Zurbrugg C, Gutierrez FR, Nguyen DH, Morel A, Koottatep T, et al. Black soldier fly larvae for organic waste treatment—prospects and constraints. *Proceedings of the Waste Safe-2nd International Conference on Solid Waste Management in the Developing Countries*. Khulna, Bangladesh. 2001.

Nguyen TTX, Tomberlin JK, Vanlaerhoven S. Ability of black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) larvae to recycle food waste. *Environ Entomol.* 2015; 44: 406–410. <https://doi.org/10.1093/ee/nvv002> PMID: 26313195

Manurung R, Supriatna A, Esyanthi RR, Putra RE. Bioconversion of rice straw waste by black soldier fly larvae (*Hermetia illucens* L.): Optimal feed rate for biomass production. *J Entomol and Zool Stud.* 2016; 4: 1036–1041

Li Q, Zheng L, Cai H, Garza E, Yu Z, Zhou S. From organic waste to biodiesel: Black soldier fly, *Hermetia illucens*, makes it feasible. *Fuel.* 2011; 90: 1545–1548

Zheng L, Li Q, Zhang J, Yu Z. Double the biodiesel yield: Rearing black soldier fly larvae, *Hermetia illucens*, on solid residual fraction of restaurant waste after grease extraction for biodiesel production. *Renew Energ.* 2012; 41: 75–79

Banks, I.J. To Assess the Impact of Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) Larvae on Faecal Reduction in Pit Latrines. Ph.D. Thesis, London School of Hygiene & Tropical Medicine, London, UK, 2014. No. 2014. pp. 1–231.

Park, K., K. Wontae, K. Eunsun, K. Kyu-won and C. Ji-young *et al.*, 2016. Oviposition site preference in black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae), in artificial rearing system. *Int. J. Industrial Entomol.*, 33: 54-58

Banks IJ, Gibson WT, Cameron MM. Growth rates of black soldier fly larvae fed on fresh human faeces and their implication for improving sanitation. *Trop Med Int Health.* 2014; 19: 14–22. <https://doi.org/10.1111/tmi.12228> PMID: 24261901

Rana KMS, Salam MA, Hashem S, Islam MA. Development of black soldier fly larvae production technique as an alternate fish feed. *Int J Res Fish Aquacult.* 2015; 5: 41–47.

Duarte, P.M.; Maciel, E.; Pinho, M.; Domingues, M.R.; Calado, R.; Lillebø, A.I.; Ameixa, O.M.C.C. Omega-3 on the fly: Long-legged fly *Machaerium maritima* as a potential source of eicosapentaenoic acid for aquafeeds. *J. Insects Food Feed* 2021, 7, 1089–1100.

Kutty, S.N., Pape, T., Wiegmann, B.M. and Meier, R., 2010. Molecular phylogeny of the Calyptratae (Diptera: Cyclorrhapha) with an emphasis on the superfamily Oestroidea and the position of Mystacinobiidae and McAlpine's fly. *Systematic Entomology* 35: 614–635. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2010.00536.x>

Prado e Castro, C.; Ameixa, O.M.C.C. Blow flies (Diptera: Calliphoridae) promising candidates as animal feed ingredients. *J. Insects Food Feed* 2021, 7, 1065–1076

Henry, M., Gasco, L., Piccolo, G. and Fountoulaki, E., 2015. Review on the use of insects in the diet of farmed fish: Past and future. *Animal Feed Science and Technology* 203:1–22. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.03.001>

Aak, A., Birkemoe, T. and Mehl, R., 2010. Blow fly (Diptera, Calliphoridae) damage on stockfish in northern Norway: pest species, damage assessment and the potential of mass trapping. *Journal of Pest Science* 83: 329–337. <https://doi.org/10.1007/s10340-010-0302-9>

Aak, A., Birkemoe, T. and Leinaas, H.P., 2011. Phenology and life history of the blow fly *Calliphora vicina* in stockfish production areas. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 139: 35 - 46. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2011.01105.x>

M.D. Finke, D. D. Oonincx, Insects as food for insectivores, in: J. Morales-Ramos, G. Rojas, D.I. Shapiro-Ilan (Eds.), *Mass Production of Beneficial Organisms: Invertebrates and Entomopathogens*, Elsevier, New York 2014, pp. 583–616.

Dobermann, D., 2017. Insects as food and feed: can research and business work together? *Journal of Insects as Food and Feed* 3: 155-160.

van Huis, A., 2017. Edible insects and research needs. *Journal of Insects as Food and Feed* 3: 3-5

van Huis A, Van Itterbeeck J, Klunder H, et al (2013) Edible insects—prospects for food and feed security. *FAO forestry paper no. 171*

M.C. Reguzzi, F. Cominelli, M. Bardone, R. Nicoli Aldini, O. Chiesa, M. Panini, G. Casu & E. Mazzoni. (2021). Unwelcome guests at farms breeding the black soldier fly, *Hermetia illucens* (L.) (Diptera Stratiomyidae). *Journal of insects as food and feed*, 7, 1177-1181. doi: [10.3920/JIFF2021.0032](https://doi.org/10.3920/JIFF2021.0032)

Dobermann, D., Swift, J. A., & Field, L. M. (2017). Opportunities and hurdles of edible insects for food and feed. *Nutrition Bulletin*, 42(4), 293–308. doi:10.1111/nbu.12291

Rumpold B., A., & Schluter O., K., (2013) Potential and challenges of insects as an innovative source for food and feed production. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 17:1–11.

Huynh, M. P., Shelby, K. S., & Coudron, T. A. (2021). Recent advances in insect rearing methodology to promote scientific research and mass production. *Insects*, 12(11), 10–13. <https://doi.org/10.3390/insects12110961>

Sule, H., Muhamad, R., Omar, D., & Hee, A. K. W. (2014). Parasitism rate, host stage preference and functional response of *Tamarixia radiata* on *Diaphorina citri*. *International Journal of Agriculture and Biology*, 16(4), 783–788.

Berggren, Å., Jansson, A. and Low, M., 2018. Using current systems to inform rearing facility design in the insect-as-food industry. *Journal of Insects as Food and Feed* 4: 167-170. <https://doi.org/10.3920/JIFF2017.0076>

International Platform of Insects for Food and Feed (IPIFF), 2020. Guide on good hygiene practices for European Union (EU) producers of insects as food and feed. IPIFF, Brussels, Belgium, 120 pp.

S. E. Donovan; M. J. R. Hall; B. D. Turner; C. B. Moncrieff (2006). Larval growth rates of the blowfly, *Calliphora vicina*, over a range of temperatures., 20(1), 106–114. doi:10.1111/j.1365-2915.2006.00600.x

Oosterbroek, P., 2006. The European Families of the Diptera. Identification, diagnosis, biology. KNNV Publishing, Utrecht, the Netherlands, 205 pp.

Prado e Castro, C., Serrano, A., Martins da Silva, P. and García, M.D., 2012. Carrion flies of forensic interest: a study of seasonal community composition and succession in Lisbon, Portugal. *Medical and Veterinary Entomology* 26: 417-431. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2012.01031.x>

Prado e Castro, C., Szpila, K., Martínez-Sánchez, A., Rego, C., Silva, I., Serrano, A.R.M. and Boieiro, M., 2016. The blow flies of the Madeira Archipelago: species diversity, distribution, and identification (Diptera, Calliphoridae s. l.). *ZooKeys* 634, 101-123. <https://doi.org/10.3897/zookeys.634.9262>

Greenberg, B. (1991) Flies as forensic indicators. *Journal of Medical Entomology*, 28, 565–577.

Hall, M.J.R., 2006. Forensic Entomology. *Science in School*, Issue 2: 49-53.

Whiting AR. 1967. The biology of the parasitic wasp *Mormoniella vitripennis* (= *Nasonia brevicornis*) (Walker). *The Quarterly Review of Biology* 42: 333-406

Hoc B, Noël G, Carpentier J, Francis F, Caparros Megido R (2019) Optimization of black soldier fly (*Hermetia illucens*) artificial reproduction. *PLoS ONE* 14: e0216160. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216160>

Giunti G, Campolo O, Laudani F, Palmeri V (2018) Male courtship behaviour and potential for female mate choice in the black soldier fly *Hermetia illucens* L. (Diptera: Stratiomyidae). *Entomol Generalis* 38:29–46

Dzepe D, Nana P, Kuintche HM, Kimpara JM, Magatsing O, Tchuinkam T, Djouaka R (2021) Feeding strategies for small-scale rearing black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) as organic waste recycler. *SN Appl Sci* 3:1–9. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-04039-5>

Booth DC, Sheppard C. Oviposition of the black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae): eggs, masses, timing, and site characteristics. *Environ Entomol.* 1984; 13: 421–423.

Tomberlin JK, Sheppard DC. Factors influencing mating and oviposition of black soldier flies (Diptera: Stratiomyidae) in a colony. *J Entomol Sci.* 2002; 37: 345–352.

Diener, S.; Zurbrugg, C.; Tockner, K. Conversion of organic material by black soldier fly larvae: Establishing optimal feeding rates. *Waste Manag. Res. J. Sustain. Circ. Econ.* 2009, 27, 603–610.

Bruno, D., M. Bonelli, A.G. Cadamuro, M. Reguzzoni, A. Grimalidi, M. Casaterlli and G. Tettamanti: The digestive system of the adult *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae): Morphological features and functional properties. *Cell Tiss. Res.*, 378, 221-238 (2019).

Zhou, F.; Tomberlin, J.K.; Zheng, L.; Yu, Z.; Zhang, J. Developmental and Waste Reduction Plasticity of Three Black Soldier Fly Strains (Diptera: Stratiomyidae) Raised on Different Livestock Manures. *J. Med. Entomol.* 2013, 50, 1224–1230.

Li Q, Zheng L, Cai H, Garza E, Yu Z, Zhou S. From organic waste to biodiesel: Black soldier fly, *Hermetia illucens*, makes it feasible. *Fuel.* 2011; 90: 1545–1548

Zheng L, Li Q, Zhang J, Yu Z. Double the biodiesel yield: Rearing black soldier fly larvae, *Hermetia illucens*, on solid residual fraction of restaurant waste after grease extraction for biodiesel production. *Renew Energ.* 2012; 41: 75–79.

Sule, H., Muhamad, R., Omar, D., & Hee, A. K. W. (2014). Parasitism rate, host stage preference and functional response of *Tamarixia radiata* on *Diaphorina citri*. *International Journal of Agriculture and Biology*, 16(4), 783–788.

Kaneshrajah, G., & Turner, B. (2004). *Calliphora vicina* larvae grow at different rates on different body tissues. *International journal of legal medicine*, 118(4), 242–244. <https://doi.org/10.1007/s00414-004-0444-5>

Godoy W A C, Von Zuben F J, Von Zuben C J, Reis S F (2001) Spatio-temporal dynamics and transition from asymptotic equilibrium to bounded oscillations in *Chrysomya albiceps* (Diptera, Calliphoridae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 627-634.

Estrada, D. A., Grella, M. D., Thyssen, P. J., & Linhares, A. X. (2009). Taxa de desenvolvimento de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) em dieta artificial acrescida de tecido animal para uso forense. *Neotropical Entomology*, 38(2), 203–207. doi: 10.1590/S1519-566X2009000200006

Parra J R (1990) Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico. Piracicaba, ESALQ, 125p.

Tomberlin JK, Sheppard DC. Factors influencing mating and oviposition of black soldier flies (Diptera: Stratiomyidae) in a colony. *J Entomol Sci.* 2002; 37: 345–352.

Nakamura S, Ichiki RT, Shimoda M, Morioka S. Small-scale rearing of the black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae), in the laboratory: low-cost and year-round rearing. *Appl Entomol Zool.* 2016; 51: 161–166.

Zhang J, Huang L, He J, Tomberlin JK, Li J, Lei C, et al. An artificial light source influences mating and oviposition of black soldier flies, *Hermetia illucens*. J Insect Sci. 2010; 10: 202. <https://doi.org/10.1673/031.010.20201>

Sheppard DC, Tomberlin JK, Joyce JA, Kiser BC, Sumner SM. Rearing methods for the black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae). J Med Entomol. 2002; 39: 695–698

Oonincx DGAB, Volk N, Diehl JJE, van Loon JJA, Belušič G. Photoreceptor spectral sensitivity of the compound eyes of black soldier fly (*Hermetia illucens*) informing the design of LED-based illumination to enhance indoor reproduction. J Insect Physiol. 2016; 95: 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.10.006>

Heussler CD, Walter A, Oberkofler H, Insam H, Arthofer W, et al. (2018) Influence of three artificial light sources on oviposition and half-life of the Black Soldier Fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae): Improving small-scale indoor rearing. PLOS ONE 13(5): e0197896. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197896>