UFRRJ
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

DISSERTAÇÃO

Determinação da exigência em proteína bruta de larvas de *Hermetia illucens* em fase de cria e seus efeitos sobre a expressão de enzimas proteolíticas

Nicolas Suzano Dourado

2026

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

Determinação da exigência em proteína bruta de larvas de *Hermetia illucens* em fase de cria e seus efeitos sobre a expressão de enzimas proteolíticas

Nicolas Suzano Dourado

Sob a Orientação do Professor
Vinicius Pimentel Silva

e Co-orientação do Professor
Diego Alejandro Flores Padrón

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre,** no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Área de Concentração Zootecnia

Seropédica, RJ

Fevereiro de 2026

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Dourado, Nicolas Suzano, 2000-
D739d Determinação da exigência em proteína bruta de larvas de Hermetia illucens em fase de cria e seus efeitos sobre a expressão de enzimas proteolíticas / Nicolas Suzano Dourado. - Rio de Janeiro, 2026.
200 f.: il.

Orientador: Vinicius Pimentel Silva.
Coorientador: Diego Alejandro Flores Padrón.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Ciência Animal, 2026.

1. Black Soldier Fly. 2. Enzima Digestiva. 3. Nutrição Animal. I. Pimentel Silva, Vinicius, 1981-, orient. II. Alejandro Flores Padrón, Diego, 1989-, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Ciência Animal. IV. Título.

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

TERMO Nº 79 / 2026 - PPGZ (12.28.01.00.00.00.00.61)

Nº do Protocolo: 23083.007776/2026-21

Seropédica-RJ, 23 de fevereiro de 2026.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

NICOLAS SUZANO DOURADO

Determinação da exigência em proteína bruta de larvas de *Hermetia illucens* em fase de cria e seus efeitos sobre a expressão de enzimas proteolíticas

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre(a) no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de Concentração em Zootecnia.

Dissertação aprovada em 23 de fevereiro de 2026.

BANCA EXAMINADORA

DR. VINICIUS PIMENTEL SILVA
Orientador - UFRRJ

DR. EMERSON GUEDES PONTES
Examinador Externo ao Programa - UFRRJ

DR. FELIPE DILELIS DE RESENDE SOUSA
Examinador Externo à Instituição - ESALQ

DR. GUARACI DURAN CORDEIRO
Examinador Interno - UFRRJ

(Assinado digitalmente em 24/02/2026 16:58)
EMERSON GUEDES PONTES
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DBQ (11.39.00.24)
Matrícula: 1555317

(Assinado digitalmente em 23/02/2026 16:34)
GUARACI DURAN CORDEIRO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DPA (12.28.01.00.00.00.00.63)
Matrícula: 3391451

(Assinado digitalmente em 23/02/2026 16:25)
VINICIUS PIMENTEL SILVA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptNAP (12.28.01.00.00.00.00.62)
Matrícula: 1899630

(Assinado digitalmente em 24/02/2026 15:14)
FELIPE DILELIS DE RESENDE SOUSA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 121.212.687-40

Visualize o documento original em **https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp** informando seu número: **79**, ano: **2026**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **23/02/2026** e o código de verificação: **d1ca339121**

“Sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá.”

— Ayrton Senna

“Se aprendesse qualquer coisa, necessitaria aprender mais, e nunca ficaria satisfeito.”

— Graciliano Ramos, Vidas Secas

“Excelência não é um lugar aonde você chega. Excelência é um horizonte.”

— Mario Sergio Cortella, Qual é a tua obra?

“…The extraordinary is what we do, not who we are.”

— Lara Croft, Tomb Raider

“Ninguém baterá tão forte quanto a vida. Porém, não se trata de quão forte pode bater, se trata de quão forte pode aguentar apanhar e permanecer de pé.”

— Rocky Balboa, Rocky Balboa

“...Parece evidente que no aprendizado é eficaz, muito mais do que uma obrigação ameaçadora, a curiosidade livre.”

— Santo Agostinho, Confissões de Santo Agostinho

DEDICATÓRIA

Ao meu pai e minha mãe, Claudio e Aline, que renunciaram seus sonhos, para que eu pudesse ter condições conquistar os meus. Vocês são os alicerces que me compõem, me ensinaram tudo que sei e que desistir nunca é uma opção. As vezes a vida aperta um pouco, mas aprendi com vocês que se tiver apenas 1% de chance de conseguir, eu vou lutar.

Aos meus avós, Tania e Valdecir, que por grande parte de minha vida, foram responsáveis por me criarem, me ensinaram, muito do que sei e que sempre há um lado bom em uma situação difícil. Obrigado também, vô, por ter me levado ao seu trabalho e me mostrado a ciência e a pesquisa. Aquelas idas ao laboratório, foram responsáveis por fomentar a vontade de pesquisar e querer ser como o senhor.

A todos os animais que tive e tenho convívio: Banzé, Tieta, Luna, May, Xurupita, Charlote, Mel, Linguado, Deby, Paçoca, Pitty, Luffy, Tortinha, Doidinha, Zeus, Mia e Dom Quixote. Obrigado por fomentarem minha vontade de aprender sobre os animais, ajudá-los de alguma forma e por me ensinarem um amor puro e belo, que só vocês são capazes de ensinar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por guiar-me em momentos em que achei que estava perdido.

Aos meus pais, Aline e Claudio, que estiveram em todos os momentos me apoiando em minhas decisões, dando condições e sempre promovendo palavras de conforto ou somente um abraço. Abraço este, capaz de calar todos os problemas e reduzir as angústias. Eu amo vocês.

Aos meus avós, por todo apoio e auxílios. Que sempre me perguntavam se eu precisava de alguma coisa, pois sabiam que eu estava com muitas tarefas do mestrado. E as vezes enviavam uma pequena marmita, capaz de transportar consigo todo o carinho e amor. E aquilo me dava mais ânimo para continuar me dedicando ainda mais aos meus deveres.

A minha namorada, Catarina, que sempre foi meu apoio durante toda essa trajetória, me mandando parar de duvidar de mim mesmo, erguer a cabeça e acreditar que eu era verdadeiramente capaz de fazer. Suas palavras de apoio não eram somente palavras, muitas vezes eram o combustível para o desenvolvimento de tudo isso aqui. Aquelas noites viradas no laboratório "varrendo" larvinhas, não foram fáceis, mas com você, se tornaram uma aventura. Obrigado por estar sempre ao meu lado, eu te amo.

Aos meus sogros, Aline e Etelberto, que sempre me apoiaram e promoveram palavras de apoio. E à minha cunhada e seu namorado, Carol e Thalles, muito obrigado por todo apoio e amizade.

Aos meus amigos, que tornaram esta jornada mais leve e me incentivaram em todos os momentos, em especial: Aylla, Carla, Daniel, Gabriel de Andrade, Gabriel Santos, Kaio, Michele e Yuri. Vocês são incríveis, ver a evolução de vocês, sempre me motiva a me tornar uma pessoa melhor. Obrigado amigos.

Aos meus amigos do RUMINALAB, em especial, Laryssa e Júlia. Muito obrigado por todas as conversas, cafezinhos e brincadeiras. Vocês tornaram a jornada muito mais tranquila e animada.

Ao meu orientador, Vinicius Pimentel, obrigado por todo o apoio, chamadas de atenção, cobranças etc. Entendo que tudo isso foi para que eu evoluísse. O senhor dedicou quatro anos à minha formação e, a cada vez que o conhecia mais, mais tinha certeza do exímio profissional que o senhor é, tanto como orientador quanto como professor. Se hoje sou capaz de entrar em uma sala de aula e ministrar uma aula, seminário ou palestra, muito se deve à dedicação do senhor em ensinar-me. Muito obrigado por ter confiado este projeto a mim, desafiando-me a tornar-me cada vez melhor. Obrigado por tudo, professor!

A equipe do LABNUTRI durante toda essa jornada. Plínio, obrigado por todo conhecimento passado, pelas brincadeiras, conversas, conselhos, por tudo,

você é incrível! Maria, Davi e Rayane, e aos alunos de vivência, obrigado por toda amizade, dedicação, conversas e brincadeiras. Vocês tornaram a realização deste projeto possível e com certeza, que sua execução fosse muito mais tranquila e alegre, muito obrigado! E por último, mas não menos importante, Amanda, obrigado pela sua amizade, foi incrível trabalhar ao seu lado. Ver toda sua dedicação, empenho e esforço, aquilo me motivava a também querer ser melhor. Muito obrigado por permitir que eu participasse de sua formação e por todas as conversas, brincadeiras e conselhos trocados.

Agradeço também à professora Joyce Sato, que além de professora é uma grande amiga e que em diversos momentos se fez presente para uma conversa de corredor ou outra vezes quando eu ia à sua sala para poder falar sobre qualquer coisa, desde elaboração de projetos a uma conversa descontraída. Muito obrigado, Joyce, a sua influência na minha formação profissional e pessoal, é uma certeza.

Ao professor João Paulo Pacheco Rodrigues, que me ensinou a questionar tudo na pesquisa, e aprender que o básico, quando bem entendido, ele é ouro. Obrigado por toda paciência e dedicação em ensinar-me a entender um pouco melhor este universo que é a estatística experimental e seus princípios.

Obrigado a todos que passaram pela minha vida e contribuíram com minha formação pessoal e acadêmica!

A todos, sei que as vezes acabei me ausentando de aniversário, eventos etc. Não era fácil, mas eu saberia que valeria a pena. E agradeço muito a todos que entenderam. Muito obrigado por todo apoio e este é o resultado deste grande esforço e dedicação.

RESUMO GERAL

DOURADO, Nicolas Suzano. **Determinação da exigência em proteína bruta de larvas de *Hermetia illucens* em fase de cria e seus efeitos sobre a expressão de enzimas proteolíticas**. 2026. 200p Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Instituto de Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2026.

Os substratos de criação de larvas de *Hermetia illucens* (LMSN) compostos por resíduo pré-consumo humano (RPCH) apresentam alta variabilidade nutricional que impactam no atendimento das exigências nutricionais em proteína e na atividade enzimática proteolitica. Neste modelo de produção, desconhece-se a exigência em proteína de larvas nas suas diferentes fases de produção. Objetivou-se determinar a exigência de proteína bruta dietética e os impactos sobre a atividade enzimática do trato digestivo de larvas de cria. Utilizou-se delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema de medidas repetidas: 5x4 (n=6). Os tratamentos foram o teor de proteína bruta dietética (%PB): PB22%, PB19%, PB15%, PB13% e PB6%. O período foi representado pelos dias de ciclo de crescimento na fase de cria, com abates nos dias: D7, D8, D9 e D10. As dietas foram compostas por RPCH, amido de milho e fibra de coco. Os ingredientes foram misturados para causar a diluição proteica e a umidade foi ajustada para 84%. Utilizaram-se caixas plásticas contendo 0,2g de ovos e 717g de dieta úmida/repetição, mantidos em ambiente com temperatura e umidade controlados. No sétimo dia, realizou-se separação manual das larvas e *frass*, os dados das pesagens foram registrados para efeito de cálculos de bioconversão. Larvas vivas foram separadas para coleta de imagem e determinação do peso vivo e coleta dos intestinos para determinação da atividade enzimática. A determinação da atividade enzimática foi realizada através de SDS-PAGE parcialmente desnaturante. As larvas foram abatidas por imersão em água fervente e, juntamente com o *frass*, foram postas para secar para determinação da composição nutricional. As variáveis de produção foram analisadas através do software SAS® Studio, utilizando PROC MIXED. Os efeitos de tratamento foram avaliados em contrastes polinomiais de ordem linear e quadrática, com coeficientes ajustados através da função "orpol" do PROC IML. Adotou-se alfa igual a 0.05. Observaram-se melhores desempenhos produtivos nas larvas de cria quando produzidas em teores entre 19 e 22% de PB, sendo sete dias suficientes para atingirem o máximo desempenho. Quanto a atividade enzimática, a maior atividade foi encontrada no tratamento de 19% de PB. Conclui-se que o teor dietético de 19% PB apresenta melhor desempenho produtivo e que sete dias de crescimento na fase de cria, são suficientes para o máximo desempenho larval em dietas contendo RPCH, o que contribui para a redução das perdas nitrogenadas.

Palavras-chave: *Black Soldier Fly*, Enzima Digestiva, Nutrição Animal

GENERAL ABSTRACT

DOURADO, Nicolas Suzano. **Determination of the crude protein requirement of *Hermetia illucens* larvae during the rearing phase and its effects on the expression of proteolytic enzymes**. 2026. 200p. Dissertation (Master Science in Animal Science) Institute of Animal Science, Animal Science Graduate Program, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

Substrates for rearing *Hermetia illucens* larvae (black soldier fly larvae, BSFL) composed of pre-consumer human food residues (PCHFR) exhibit high nutritional variability, which affects the ability to meet protein requirements and influences proteolytic enzymatic activity. In this production model, the protein requirements of larvae across different production phases remain unknown. This study aimed to determine the dietary crude protein requirement and its effects on digestive tract enzymatic activity in starter-phase larvae. A completely randomized experimental design with repeated measures was used in a 5 × 4 factorial arrangement (n = 6). Treatments consisted of dietary crude protein levels (%CP): CP22%, CP19%, CP15%, CP13%, and CP6%. The period was represented by the number of days in the growth cycle during the starter phase, with sampling on days D7, D8, D9, and D10. Diets were composed of PCHFR, corn starch, and coconut fiber. The ingredients were mixed to promote protein dilution, and moisture was adjusted to 84%. Plastic containers containing 0.2 g of eggs and 717 g of wet diet per replicate were maintained in a controlled-temperature, controlled-humidity environment. On the seventh day, larvae and *frass* were manually separated, and weight data were recorded for bioconversion calculations. Live larvae were separated for image acquisition, determination of live weight, and collection of the intestines for enzymatic activity assays. Enzymatic activity was determined by SDS-PAGE using partial denaturation. The larvae were euthanized by immersion in boiling water and, together with the *frass*, were dried for nutritional composition analysis. Production variables were analyzed in SAS® Studio using PROC MIXED. Treatment effects were evaluated using linear and quadratic polynomial contrasts, with coefficients adjusted using the "orpol" function of PROC IML. A significance level of alpha equals 0.05 was adopted. Improved productive performance was observed in starter-phase larvae reared on diets containing 19 and 22% CP, with 7 days sufficient to achieve maximum performance. In enzymatic activity, zymography showed a pattern of 6 bands. Proteolytic enzymatic activity was higher at 19% CP. It is concluded that a dietary level of 19% crude protein (CP) promoted the best larval productive performance and that a seven-day growing period was sufficient to achieve maximum performance in diets containing RPCH, which contributes to a reduction in nitrogen losses.

Keywords: Animal Nutrition, Black Soldier Fly, Digestive enzyme.

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SÍMBOLOS

BC (%) – Bioconversão

BN – Balanço de nitrogênio

BSFL – Black soldier fly larvae

CNF – Carboidratos não fibrosos

DGM – Diâmetro geométrico médio

EEL – Extrato etéreo larval (%)

ENN – Extrativo não nitrogenado

EUNF (%) – Eficiência do uso de nitrogênio pelo *frass*

EUNL (%) – Eficiência do uso de nitrogênio larval (%)

gNF – Nitrogênio no *frass* (g)

gNL – Nitrogênio larval (g)

LMSN – Larva de mosca soldado negro

MS – Matéria seca

MSF - Matéria seca do *frass* (%)

MSL Matéria seca da larva (%)

MSN – Mosca soldado negro

N – Nitrogênio

NAG - N-Acetil-Beta-Glicosaminidase

PB – Proteína Bruta

PBF – Proteína bruta do *frass* (%)

PBL – Proteína bruta larval (%)

PerdaN – Perda de Nitrogênio (%)

RPCH – Resíduo pré-consumo humano

TRL – Nível de prontidão tecnológica

UA – Unidade de atividade enzimática arbitrária

UA% - Unidade de atividade enzimática arbitrária relativizada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL 1
CAPÍTULO I 3
2 CAPÍTULO I – O estado de arte da experimentação de exigência nutricional com *Hermetia illucens* e seus aspectos biológicos e metabólicos 3
RESUMO 3
ABSTRACT 4
2.1 INTRODUÇÃO 5
2.2 REVISÃO DE LITERATURA 6
2.2.1 Aspectos biológicos da *Hermetia illucens* 6
2.2.1 Morfologia 6
2.2.3 Biologia e comportamento no substrato 8
2.2.4 Adaptabilidade da larva de mosca soldado negro 11
2.2.4.1 Digestão e metabolismo de nitrogênio na LMSN 11
2.2.5 Exigência nutricional – Animais domésticos x insetos 14
2.2.6 Viabilidade de aplicação de métodos experimentais tradicionais em LMSN 17
2.2.7 Enzimas digestivas proteolíticas da LMSN 18
2.3 CONCLUSÕES 21
2.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 22
CAPÍTULO II 28
3 CAPÍTULO II – Exigência em proteína bruta de larvas de *Hermetia illucens* em fase de cria alimentadas com resíduo orgânico pré consumo humano e seus impactos sobre os indicadores de produção 28
RESUMO 28
ABSTRACT 29
3.1 INTRODUÇÃO 30
3.2 MATERIAL E MÉTODOS 32
Local 32
Colônia utilizada de LMSN 32
Delineamento Experimental 32
Formulação das dietas 32
Ensaio de criação das LMSN 34
Peso médio larval e total de larvas e densidades 34
Bioconversão 35
Balanço de Nitrogênio 35
Procedimento de abate 36

Análises Bromatológicas 36
Análise Estatística 36
3.3 RESULTADOS 37
3.4 DISCUSSÃO 72
3.5 CONCLUSÕES 77
3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 78
CAPÍTULO III 83
4 CAPÍTULO III – Alterações enzimáticas no trato digestivo de larvas de *Hermetia illucens* produzidas em dietas com diferentes teores proteicos 83
RESUMO 83
ABSTRACT 84
4.1 INTRODUÇÃO 85
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS 87
Local 87
Colônia utilizada de LMSN 87
Delineamento Experimental 87
Formulação das dietas 87
Ensaio de criação das LMSN 89
Dissecação de intestinos 89
Determinação de atividade proteolítica – Eletroforese e zimograma 90
4.3 RESULTADOS 92
4.4 DISCUSSÃO 101
4.5 CONCLUSÃO 102
4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 103
5. CONCLUSÕES GERAIS 105
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 106
ANEXOS 116
Anexo A – CEUA, Código e saída estatística 116

1 INTRODUÇÃO GERAL

Há crescente utilização da larva de mosca soldado negro (LMSN) (*Hermetia illucens)* e de seus derivados como ingredientes na alimentação de diversas espécies de animais domésticos. Dentre os produtos da LMSN regularmente autorizados pelo MAPA como ingrediente temos: a larva abatida *in natura*, a gordura, farinha integral e a farinha desengordurada (BRASIL, 2023). A mais utilizada é a farinha desengordurada, considerada como um concentrado proteico. Atualmente, há demanda pela matéria prima no mercado "*Business to Business*" de alimentação animal, o que causa a necessidade do escalonamento da produção de insetos para o abastecimento das fábricas de ração.

O cenário da produção de insetos é promissor, contudo, existem desafios tecnológicos a serem superados. O nível de prontidão tecnológica (TRL) leva em consideração os aspectos de prontidão de mercado, regulatório, de aceitação da tecnologia pelo mercado e de prontidão organizacional (Vik et al., 2021). Empresas do mundo todo ligadas a produção animal já fazem ou possuem interesse no uso da farinha de LMSN em seus produtos. De forma que, o mercado consumidor associado à alimentação animal, está extremamente disposto a absorver a inclusão da farinha e gerar novos produtos e oportunidades de negócio.

Tal fato pressiona as biofábricas de insetos no desenvolvimento de sistemas de produção sustentáveis e de baixo custo, com o objetivo de competir com matérias primas tradicionalmente utilizadas na alimentação dos animais domésticos, tais como a farinha de peixe e o farelo de soja (Siddiqui et al., 2022; Zulkifli et al., 2022). Pressionando-as cada vez mais a produzirem derivados de LMSN de composição química uniformes, sem oscilação da matriz nutricional da matéria prima. São inúmeros os estudos que fazem o uso dos derivados de insetos na alimentação animal, sejam como ingrediente ou aditivo. As vantagens e limitações de uso (Freel et al., 2021; Dilelis et al., 2025) são conhecidas, demonstrando evidente aceitação do mercado consumidor.

Contudo, para que as biofábricas de insetos consigam escalonar a produção, precisam conhecer os indicadores do modelo de produção de LMSN. Os modelos de criação podem ser de ciclo único ou duplo, que consiste na frequência de alimentação das larvas. Porém, para definir qual modelo de negócio adotar ou, qual tipo de dieta será utilizada, precisa-se definir as exigências nutricionais. São escassos os estudos que definem as exigências nutricionais para as diferentes fases de criação LMSN (Sheppard et al., 2002; Broeckx et al., 2021; Hosseindoust et al., 2023). Evidencia-se, portanto, a lacuna de conhecimento que interfere diretamente na qualidade/uniformidade das matérias primas derivadas de LMSN disponíveis atualmente no mercado. A determinação da exigência nutricional das LMSN permite a padronização dos teores nutricionais dietéticos desta espécie animal. Estudos demonstram que a faixa de inclusão entre 15% e 19% de proteína bruta são adequadas (Oddon et al., 2022; Schneider et al., 2025a). Porém, indicadores de produção consistentes e estudos planejados especificamente para compreender as exigências nutricionais da LMSN são limitados (Miranda; Cammack; Tomberlin, 2020; Dzepe et al., 2021).

Existem limitações práticas experimentais inerentes ao sistema de produção das larvas, quando se compara com aqueles tradicionais de não ruminantes e ruminantes. Metodologias de determinação de exigências já consolidadas na experimentação animal tradicional, tais como: dose-resposta, ensaios fatoriais e abate comparativo (Sakomura *et al*., 2016) precisam de adaptações quando aplicados na pesquisa com a LMSN. A determinação da exigência em proteína é imprescindível para viabilizar a produção da LMSN, pois trata-se do nutriente mais

oneroso de uma formulação. A subalimentação proteica reduz a produção, enquanto o excesso de proteína, é um desperdício (Lee, et al., 2026). O nitrogênio excedente será encaminhado para rotas de excreção e, em seguida, convertido em formas voláteis nitrogenadas por bactérias que vivem no substrato (Smets; Claes; Van Der Borght, 2021; Zhao et al., 2025). Desta forma, dietas desbalanceadas em proteína podem ser responsáveis por danos ambientais (Zhao et al., 2025).

Ademais, estudos focados na atividade proteolítica da LMSN ainda se encontram em desenvolvimento. Embora já existam pesquisas abrangendo a ordem dos dípteros, essas ainda não se aprofundam especificamente na LMSN. A realização de estudos direcionados a essa espécie permitirá determinar com maior precisão seu potencial máximo de aproveitamento dos teores de PB presentes na dieta. Isso se deve ao fato de que a atividade proteolítica está diretamente relacionada à capacidade das enzimas proteolíticas de atuarem de forma eficiente, conforme as condições fisiológicas do organismo.

O presente estudo objetiva determinar a exigência nutricional de proteína bruta da larva de mosca soldado negro na fase de cria e a influência dos diferentes teores proteicos sobre a atividade proteolítica do trato gastrointestinal em diferentes pHs.

CAPÍTULO I

2 CAPÍTULO I – O estado de arte da experimentação de exigência nutricional com *Hermetia illucens* e seus aspectos biológicos e metabólicos

RESUMO

A produção de *Hermetia illucens* tem recebido grande atenção no cenário mundial devido à busca por ingredientes alternativos, ecológicos e funcionais na alimentação animal. Entretanto, as pesquisas realizadas com este inseto são muitas vezes de escala laboratorial e tendem a não seguir aspectos biológicos naturais deste animal. O que leva a desafios na experimentação e, até mesmo na aplicação dos dados de produção em escala industrial. Desta forma, objetivou-se reunir trabalhos que abordaram aspectos biológicos, metabólicos e experimentais com a larva de *Hermetia illucens* a fim de elucidar o cenário atual de experimentação e produção. A revisão baseou-se em artigos coletados em bases de dados de periódicos internacionais sobre a temática. Os estudos quanto a biologia, demonstram que a larva de mosca soldado negro (LMSN) é capaz de consumir grande variedade de matéria orgânica em decomposição, devido a seu aparelho bucal. Entretanto, aspectos físico-químicos do substrato alimentar, tais como, a fermentação, umidade e textura, são capazes de alterar o desempenho da LMSN. A faixa de umidade entre 70 e 80% apresentam-se como ideais para a criação. A larva apresenta sistema digestivo completo, com a preensão do alimento pela boca. O intestino divide-se em três partes: anterior, médio e posterior. A digestão e absorção dos nutrientes ocorre principalmente no intestino médio. Estudos demonstram que a LMSN apresenta a habilidade de adaptar-se ao substrato através da modulação da produção e da atividade de enzimas proteolíticas. Atualmente, a utilização de técnicas adaptadas da experimentação com animais domésticos ainda está em fase de ajuste para a LMSN. Assim como a utilização da técnica de diluição dietética, que pode ser aplicada a fim de determinar exigências nutricionais da LMSN. Possibilitando o preenchimento de lacunas nutricionais observadas na experimentação com a espécie. Conclui-se que os estudos com a *Hermetia illucens* demonstram teores de proteína dietética diferentes para cada fase do ciclo produtivo, como 19% para “cria” e 15% para “recria”. Contudo, ainda não há comprovação de que a produção de ciclo duplo apresenta desempenho superior quando comparada com a de ciclo único, tanto para os índices produtivos quanto para modulação enzimática.

Palavras-chave: Entomologia, Enzimas digestivas, Fisiologia digestiva, Larvas, Nutrição animal

ABSTRACT

The production of *Hermetia illucens* has received considerable attention worldwide due to the search for alternative, sustainable, and functional ingredients for animal nutrition. However, research conducted on this insect is often limited to laboratory scale and tends not to follow the natural biological aspects of the species, which leads to challenges in experimentation and even in the application of production data at an industrial scale. Thus, the objective of this study was to compile works addressing the biological, metabolic, and experimental aspects of *Hermetia illucens* larvae to elucidate the current state of experimentation and production. The review was based on articles collected from databases of international journals on the subject. Studies on biology demonstrate that black soldier fly larvae (BSFL) are capable of consuming a wide variety of decomposing organic matter due to their mouthparts. However, physicochemical aspects of the feeding substrate, such as fermentation, moisture, and texture, can alter BSFL performance. A moisture range between 70 and 80% is considered ideal for rearing. The larvae have a complete digestive system and ingest food through the mouth. The intestine is divided into three parts: foregut, midgut, and hindgut. Digestion and nutrient absorption occur mainly in the midgut. Studies show that BSFL can adapt to the substrate by modulating the production and activity of proteolytic enzymes. Currently, the use of techniques adapted from experimentation with domestic animals is still in the adjustment phase for BSFL, as is the application of the dietary dilution technique, which can be used to determine BSFL's nutritional requirements and help fill nutritional gaps observed in experimentation with the species. It is concluded that studies on *Hermetia illucens* indicate different dietary protein levels for each phase of the production cycle, such as 19% for the "growing" phase and 15% for the "fattening" phase. However, there is still no evidence that a dual-cycle production system outperforms a single-cycle system in terms of productivity indices or enzymatic modulation.

Key words: Entomology, Digestive enzymes, Digestive Physiology, Larvae, Animal Nutrition.

2.1 INTRODUÇÃO

Assim como nas culturas de insetos tradicionais: como abelhas e bicho da seda (Imperatriz-Fonseca; Nunes-Silva, 2010; Santos; Vidigal; Merlini, 2011), é necessário desenvolver o conhecimento básico da produção da LMSN. Desenvolver o manejo alimentar, instalações e determinação de exigências nutricionais. A partir desta base do conhecimento de produção será possível intensificar a produção industrial, tanto para equipamentos, quanto para a nutrição e melhor aproveitamento das dietas. Desta forma, o interesse por estudos sobre o cultivo de *Hermetia illucens* tem se intensificado durante a última década.

Inúmeros estudos de escala laboratorial determinam a etologia deste inseto quando ocorre variação nas propriedades físicas da dieta (Schreven et al., 2022; Silvaraju et al., 2025). Entre 2015 e 2025, na plataforma Science Direct, foram produzidos cerca de 2.246 estudos com o termo "*Black Soldier Fly Larvae*". Sendo 21 artigos publicados em 2015, enquanto 556 artigos foram produzidos em 2025. Por conta deste interesse, este inseto deve ser produzido com base zootécnica consolidada.

Como mecanismo de viabilização da maturidade industrial deste sistema de produção, são necessários conhecimentos sólidos da biologia em condições naturais de criação. Interpretações técnicas do comportamento natural que viabilizam o desenvolvimento de instalações, manejos alimentares e nutricionais. Estudos laboratoriais podem não refletir a realidade do hábito do inseto, com consequentes desafios que serão encontrados no processo de "Scale up" industrial. Porém, são necessários, pois fornecem direcionamento com embasamento científico (Francis; Schmitt; Smetana, 2025).

A experimentação com a *H. illucens*, com o objetivo de determinação da exigência nutricional, dependem de técnicas experimentais zootécnicas tradicionais que não são adaptadas para a produção de LMSN. Pois trata-se de um inseto que se desenvolve e produz suas excretas no seu substrato alimentar (Spranghers *et al.*, 2017).

Dada a esta peculiaridade, é imprescindível voltar o olhar ao comportamento biológico deste animal na natureza. Permitindo que avanços na experimentação animal ocorram através do aproveitamento/mimetização destes comportamentos. Assim como ocorreu para os ajustes de temperatura e umidade na produção (Chia *et al.*, 2018; Siddiqui *et al.*, 2025).

As demandas industriais serão atendidas quando os indicadores de produção forem conhecidos e consolidados. Portanto, a aplicação de conceitos zootécnicos atende esta demanda, direcionando a experimentação e os avanços tecnológicos com o suporte científico. A presente revisão tem como objetivo reunir trabalhos que abordaram os aspectos biológicos, metabólicos e experimentais com a larva de *H. illucens* a fim de elucidar o cenário atual de experimentação e produção quanto aos teores de proteína dietética.

2.2 REVISÃO DE LITERATURA

2.2.1 Aspectos biológicos da *Hermetia illucens*

A *H. illucens* (Linnaeus, 1758), também conhecida como mosca soldado negro, é um inseto que pertence a ordem Díptera, da família Stratiomyidae. Trata-se de um inseto saprófago, capaz de converter uma grande variedade de resíduos orgânicos na natureza. Inclusive aqueles considerados como resíduos pré-consumo humanos (BRASIL, 2023), podem ser transformados em biomassa larval de alta qualidade e em um biofertilizante conhecido como *frass* (Beesigamukama et al., 2020). As larvas de mosca soldado negro (LMSN) apresentam aparelho bucal com dentes especializados em triturar matéria orgânica em decomposição de diferentes origens, desde vegetais, até carcaças de animais (Figura 1) (Brenda Barros-Cordeiro; Nair Báo; Roberto Pujol-Luz, 2014; Makkar et al., 2014; Bruno et al., 2020). Além disso, aspectos físico-químicos do substrato de alimentação devem ser conhecidos, a fim de que ocorra o maior aproveitamento do alimento disponível (Bekker et al., 2021). A textura, por exemplo, é capaz de alterar a capacidade de movimentação da larva sobre o alimento, bem como está associada na disponibilidade de nutrientes solúveis provenientes da fermentação microbiana aeróbica (Bekker et al., 2021).

A MSN está presente em diferentes biomas, portanto, a depender da localização, consumirá diferentes fontes de matéria orgânica (Meneguz et al., 2018). Evolutivamente, adaptou-se com uma estratégia de sobrevivência de plasticidade enzimática, isto é, tem a capacidade de realizar modulação enzimática intestinal a fim de adaptar-se ao substrato que consome (Bonelli et al., 2020). Portanto, dentro de um cenário de produção industrial, considerar a plasticidade enzimática deste animal, possibilita a produção do inseto a partir de resíduos orgânicos provenientes de coleta seletiva (Amrul et al., 2022; Pradabphetrat; Sathawong; Pimsen, 2024).

2.2.1 Morfologia

A LMSN apresenta características de corpo cilíndrico, achatado ventro-dorsal (Figura 2). São insetos de ciclo holometábolo, apresentam metamorfose durante seu ciclo. Com características de insetos hemicefálicos, apresentam sua cabeça parcialmente desenvolvida. São hemipnêusticos, pois possuem sistema respiratório completo, realizando trocas gasosas através de espiráculos funcionais, localizados nas extremidades anterior e posterior do corpo. O ar será admitido pelos espiráculos, seguirá em direção à traqueia e através dela irá para as células e, em seguida, voltará para ser expelido pelos espiráculos (Barros-Cordeiro; Báo; Pujol-Luz, 2014).

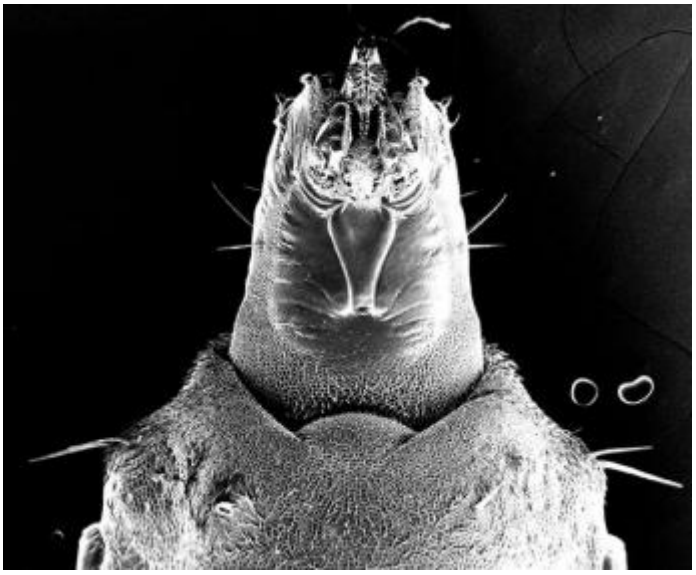


Figura 1: Aparelho bucal de larva de mosca soldado negro observada através de microscopia eletrônica (Lievens et al., 2022).



Figura 2: Larvas de mosca soldado negro com corpo achatado ventro-dorsal; Foto: Prof. Vinicius Pimentel - UFRRJ

As larvas penetram no substrato enquanto se alimentam e, literalmente “mergulham” no substrato. Desta forma, os espiráculos permitem a respiração mesmo enquanto uma parte do corpo está imersa no alimento. Entretanto, a depender da profundidade, da umidade e textura do substrato, poderão ocorrer interferências significativas nas trocas gasosas. A característica comportamental de penetrar no substrato exige que substratos profundos com mais de 6 cm sejam aerados. Barrett et al., (2023) descreveram que as larvas se alimentam principalmente na profundidade de 2 a 4 cm do substrato, onde o oxigênio está mais abundante.

O trato digestivo divide-se em segmentos destinados à digestão e à absorção de nutrientes. Sendo composta por: boca, intestino anterior, médio, posterior e reto. O segmento intestinal

anterior é formado pela faringe, esôfago, papo e proventrículo. O médio é a região mais longa e funcionalmente ativa, onde ocorre a digestão (Ação enzimática) e a absorção de nutrientes, sendo formado pela membrana peritrófica e, apresenta associado a ele o ceco gástrico. Por fim, o intestino posterior é formado pelo piloro, íleo e reto. Anexado ao intestino posterior, encontram-se os túbulos de Malpighi, responsáveis por manter a homeostasia da hemolinfa (Holtof et al., 2019).

2.2.3 Biologia e comportamento no substrato

São animais provenientes de regiões tropicais, subtropicais e temperadas, havendo, portanto, diversidades genéticas. Existem variedades que apresentam maior peso corporal, bem como colônias melhoradas geneticamente para maior produção (Silvaraju et al., 2025b). A MSN apresenta ciclo de vida que varia de 18 a 47 dias, dividido em quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto. A mosca adulta é atraída pelo odor de alimentos em decomposição e ovipõe cerca de 500 a 900 ovos (De smet *et al.*, 2018). A postura é realizada em local protegido da incidência direta da luz solar, preferencialmente, em local seco e sombreado, mas próximo da fonte úmida de alimento. Em média, os ovos eclodem após quatro dias e as larvas L_1 terão acesso aos nutrientes do alimento localmente disponível (Sheppard et al., 2002; Tariq et al., 2025).

Após a eclosão, a larva L_1 inicia o período de consumo ativo, se alimentam de partículas sólidas pequenas, de microrganismos e de nutrientes solubilizados. Nesta fase, devido ao tamanho corporal reduzido, limitações físico-químicas do substrato impactam na sobrevivência dos indivíduos. O excesso de umidade do substrato causa mortes por afogamento, de modo que a L_1 tende a se alimentar sobre a superfície do alimento disponível, evitando as lâminas de água que se formam. Quando atinge 5 dias a larva terá aparelho bucal de aproximadamente 20µm e de até 60 µm com 9 dias (Lievens et al., 2023). O consumo de alimento ativo se eleva devido a presença de dentes especializados **(**Bruno et al., 2020). A redução do tamanho de partícula do alimento, determinada pelo diâmetro geométrico médio (DGM) é uma necessidade do processo de criação zootécnica do animal. Pois há necessidade de separação larval do *frass* bem como, permite que a larva consuma dieta nutricionalmente uniforme (Lievens et al., 2023; Ogello et al., 2025). Isto é, não selecione partículas de alimento que causarão desbalanceamento nutricional, com consequente desenvolvimento desuniforme do lote de animais em sistema de produção.

A fase de alimentação ativa deste inseto ocorre enquanto larva e, neste período, passarão por 5 instares larvais. O consumo ativo dos nutrientes garante o ganho de peso e o desenvolvimento do corpo gorduroso. Contudo, existem mecanismos de sobrevivência que a depender da disponibilidade e da composição nutricional do substrato podem atrasar suas fases.

Havendo alimento digestível disponível, irá se desenvolver sem restrições e armazenar nutrientes no corpo. O armazenamento energético será efetuado através de um órgão chamado corpo gorduroso. O estoque em gordura será realizado o máximo possível, a fim de garantir a metamorfose para um adulto saudável com alta capacidade reprodutiva. Entretanto, havendo restrição nutricional no substrato, não há acúmulo de gordura adequado no corpo gorduroso (Arrese; Soulages, 2010). Neste caso, a larva adianta o ciclo como estratégia de sobrevivência. Mesmo sem atingir o máximo uso do corpo gorduroso, entra em fase de prepupa, a fim de promover a reprodução da espécie (Oddon et al., 2024; Bonelli et al., 2020; Pradabphetrat; Sathawong; Pimsen, 2024).

Na natureza, estes animais permanecem no estágio larval, por diferentes períodos, a depender da quantidade e qualidade nutricional do substrato alimentar (Seyedalmoosavi *et al.*, 2022). Em substratos nutritivos, ela acumula nutrientes suficiente para realizar sua metamorfose e ter armazenamento energético satisfatório quando tornar-se adulta. Já em condições restritivas, a LMSN alimenta-se enquanto pode. Em condições não determinadas de tempo entra na fase de pupa e realiza a metamorfose, mesmo que se torne um adulto fraco, porém promove a reprodução da espécie (Tomberlin; Adler; Myers, 2009; Barros-Cordeiro; Báo; Pujol-Luz, 2014; Broeckx *et al.*, 2021). Consequentemente, no cenário industrial e de experimentação animal, as propriedades físico-químicas que definem a qualidade do substrato irão impactar diretamente no tempo de ciclo larval, nos quais substratos mais nutritivos, a LMSN irá permanecer por menos tempo neste estágio (Bekker *et al.*, 2021), por fim, otimizando todo um sistema de produção.

Ao consumir nutrientes suficientes para o desenvolvimento, supre suas necessidades nutricionais. Garantem o processo de metamorfose em plenitude e avançam para o estágio de prepupa (6º instar), quando reduzem a movimentação (De smet *et al.*, 2018). Neste momento, a larva esvazia o trato digestivo e fará uso somente da energia armazenada no corpo gorduroso, bem como, a cutícula de revestimento da larva se torna mais rígida e altera a coloração (Sheppard et al., 2002). Neste momento, naturalmente a larva migra para um local seco e protegido da luz para realizar a pupação (Sheppard et al., 1994; Giannetti et al., 2022), podendo vir a causar dificuldades no manejo da produção. Isto porque, a depender das condições do substrato nutritivo, alta umidade, as larvas terão a tendência de realizar fuga da caixa de criação, em busca de local para realização da pupação (Bekker *et al.*, 2021).

Na fase de pupa, ocorre alteração da composição do intestino médio, com degeneração celular e a formação de novas camadas epiteliais (Bruno et al., 2019b). Enquanto pupa, a larva cessa a alimentação ativa e, assim permanecerá até atingir a fase adulta.

Quando o indivíduo adulto emerge na forma de mosca, ele não se alimenta ativamente de alimentos sólidos. Contudo, a mosca busca pontos de hidratação, pois apresenta aparelho bucal lambedor/sugador (Bruno et al., 2019b) que permite o consumo de água e nutrientes que nela estiverem solubilizados. Com essa estratégia, a mosca se mantém hidratada e consome nutrientes solúveis, como açúcares livres, o néctar, que a mantém viável reprodutivamente por mais tempo (Tomberlin; Adler; Myers, 2009; Wang; Shelomi, 2017).

Os machos adultos são passíveis de acasalarem diversas vezes, enquanto as fêmeas acasalam uma única vez. Após fecundadas são capazes de ovipositar todos os ovos em uma única postura. Podendo acasalar-se novamente, entretanto, sem a capacidade de produzir ovos (Nakamura et al., 2016). A reprodução é estimulada pelo comprimento de onda da luz solar incidindo indiretamente sobre as moscas. O comprimento de luz adequado está entre 440 e 540 nanômetros que eleva a taxa de acasalamento (Schneider, 2020).

Na natureza, a nutrição destes animais não se baseia no consumo exclusivo de grãos ou mesmo que ela seja dividida em diferentes ciclos de manejos alimentares, assim como propõem alguns modelos de criação industriais. Portanto, fornecer dietas exclusivamente formuladas com matérias primas tradicionais da produção animal convencional, como o milho e soja, bem como, fracionar a alimentação das larvas em cria (L1 – L3) e recria (L4 – L6) podem comprometer metabolismos enzimáticos deste inseto que ainda não estão bem compreendidos (Arabzadeh et al., 2022; Pradabphetrat; Sathawong; Pimsen, 2024).

A depender do substrato de alimentação em que a LMSN está inserida, sua atividade enzimática irá se adaptar (Bonelli et al., 2020), modulando-se de acordo com o perfil de nutrientes disponíveis. Portanto, a alteração abrupta do substrato alimentar fará com que a larva necessite readaptar a produção enzimática. Tal manejo alimentar de troca de dieta, pode causar redução dos indicadores de produção zootécnicos (Bonelli et al., 2020), principalmente, quando se objetiva a produção industrial com animais de ciclos produtivos muito curtos.

Tabela 1. Aspectos biológicos da LMSN e suas implicações zootécnicas na criação.

Aspecto biológico da BSF	**Implicação zootécnica na criação**
Hábito saprófago e alta capacidade de bioconversão de resíduos orgânicos	Permite o uso de resíduos agroindustriais e urbanos como substrato alimentar, reduzindo custos e aumentando a sustentabilidade do sistema produtivo
O tamanho do aparelho bucal e dos dentes aumentam conforme o desenvolvimento larval (≈20 μm → 60 μm)	Necessidade de ajuste do tamanho de partícula do alimento (DGM), garantindo consumo eficiente e desenvolvimento homogêneo do lote
Plasticidade enzimática intestinal	Permite o uso de diferentes resíduos, porém requer constância do substrato; trocas abruptas de dieta reduzem o desempenho zootécnico
Sistema respiratório traqueal holopneústico com espiráculos funcionais	Impõe limites à profundidade e compactação do substrato, demandando aeração adequada
Comportamento de penetração no substrato durante a alimentação	Define profundidade ideal do leito alimentar (2–4 cm) e necessidade de revolvimento ou aeração em camadas mais profundas
Sensibilidade das larvas jovens (L_1) ao excesso de umidade	Requer controle rigoroso da umidade do substrato para evitar mortalidade por afogamento e falhas no estabelecimento do lote
Ciclo de vida holometábolo com duração variável do estágio larval	A qualidade nutricional do substrato afeta diretamente o tempo de ciclo e a eficiência produtiva
Migração ativa da prepupa para ambientes secos e protegidos	Pode causar fuga do sistema produtivo, exigindo dispositivos de coleta ou manejo da umidade do substrato
Metabolismo adaptado a substratos orgânicos complexos	Dietas convencionais (milho e soja) podem não maximizar desempenho, exigindo cautela na formulação alimentar

2.2.4 Adaptabilidade da larva de mosca soldado negro

2.2.4.1 Digestão e metabolismo de nitrogênio na LMSN

Os alimentos consumidos pela LMSN regulam a composição química larval, tempo de ciclo de vida, sua homeostase e até mesmo a microbiota intestinal. A larva apresenta a capacidade de adaptar-se ao alimento consumido, sendo capaz de modular sua produção enzimática para ter melhor aproveitamento do alimento (Lee et al., 2008; Simpson; Raubenheimer, 2009).

Na fase larval, os alimentos serão preendidos pela boca e, o processamento dos alimentos inicia-se através da digestão realizada pelas enzimas salivares: Leucina arilamidase e N-Acetil-Beta-Glicosaminidase (NAG) (Bruno et al., 2020). A presença das enzimas diferencia-se entre as espécies de insetos. A *Musca domestica* apresenta menor atividade da enzima leucina arilamidase, quando comparada a *Hermetia illucens* (Kim et al., 2011). O intestino da LMSN é revestido por uma monocamada epitelial com lâmina basal e músculos e formado por três partes: anterior, médio e posterior (**Figura 3**) (Caccia; Casartelli; Tettamanti, 2019)

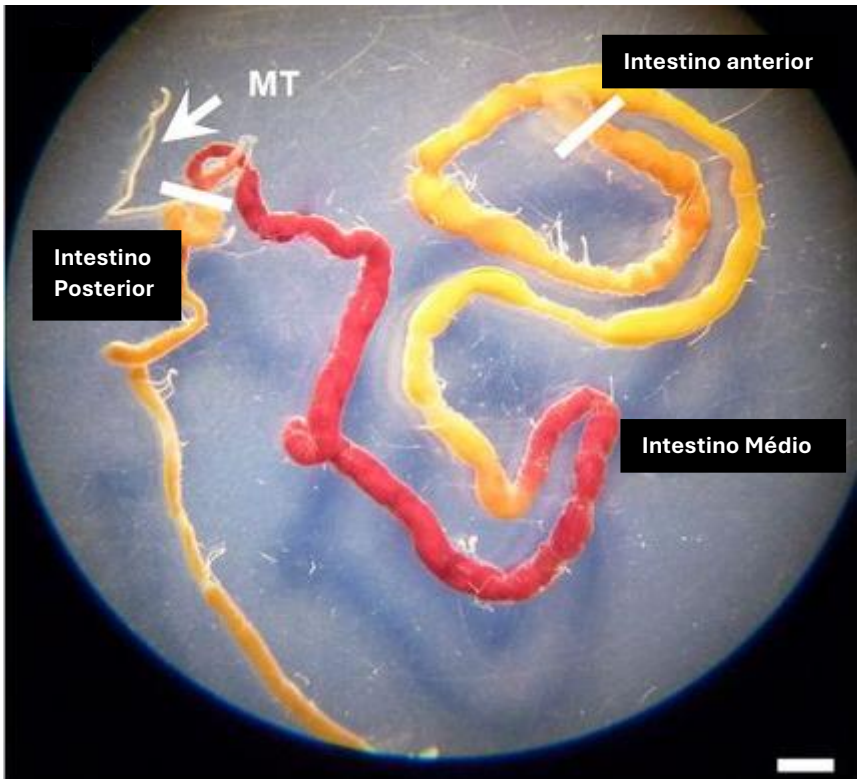


Figura 3: Organização do intestino da LMSN MT: Túbulos de malpighi. Adaptado: Bruno et al. (2019a).

No intestino anterior, a digestão torna-se ativa (Holtof et al., 2019) por meio de enzimas salivares e enzimas regurgitadas do intestino médio para o papo, entretanto, não existe tecido absortivo representativo nesse local (Eke et al., 2023).

Em seguida, o intestino médio é o mais longo e significativo para o processo absortivo, e é onde ocorre a digestão e absorção de nutrientes de forma ativa. A sua extensão é formada

por epitélio com células colunares, endócrinas, células tronco e células cuprofílicas e de ferro (Dubreuil, 2004; Bruno et al., 2025a). Na região anterior do intestino médio o pH está próximo de 6 e são secretadas enzimas responsáveis pela digestão de polissacarídeos e lipídeos. Na porção média, as células cuprofílicas são responsáveis pela acidificação do segmento para pH 2. Neste segmento, ocorrerá a desnaturação proteica e eliminação de possíveis patógenos através da presença de lisozimas e do pH ácido (**Figura** 4) (Bruno et al., 2019a).

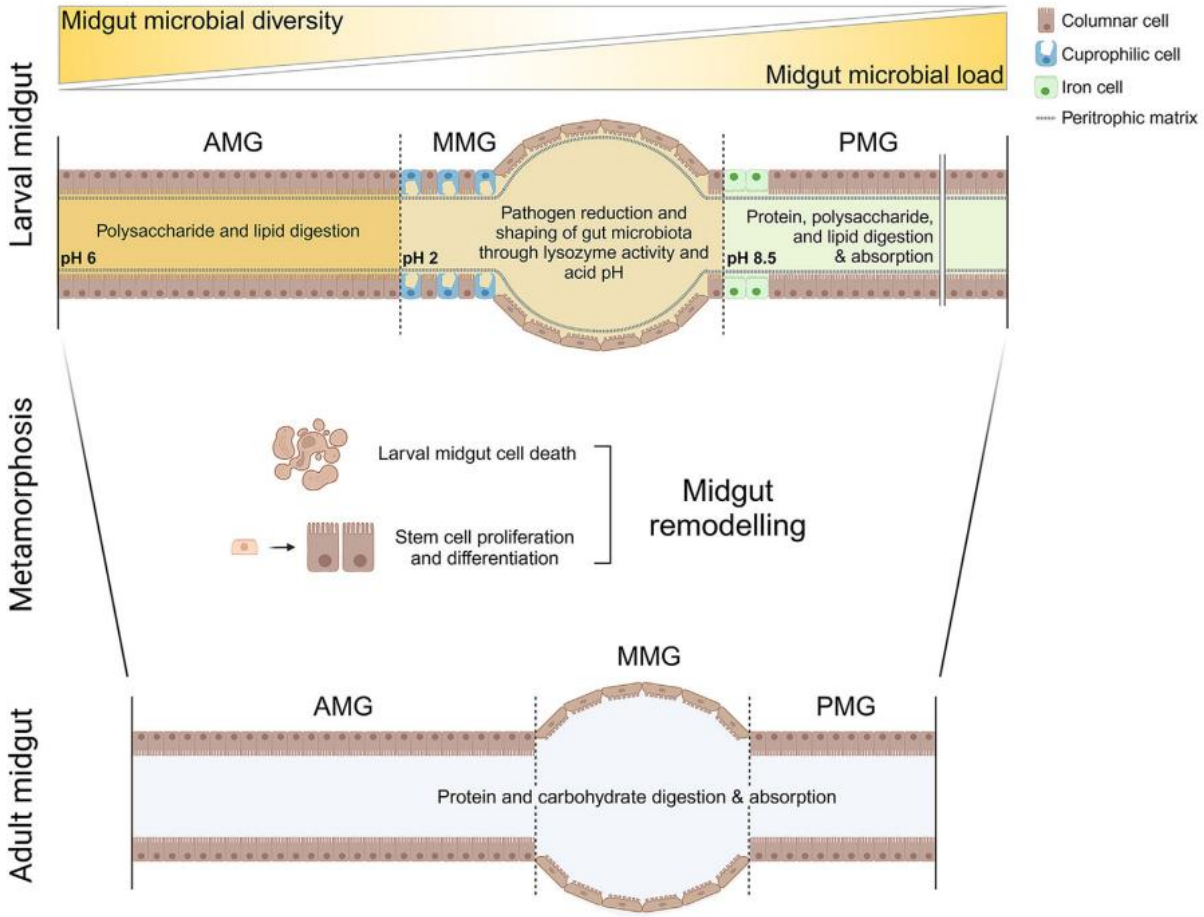


Figura 4. Representação esquemática do intestino médio da LMSN durante o desenvolvimento. AMG: Intestino médio porção anterior; MMG: Intestino médio porção medial e intestino médio porção posterior. Adaptado: Bruno et al. (2025)

O segmento posterior do intestino médio apresenta células de ferro e pH alcalino de 8,5 e, é responsável pela digestão de proteínas. As enzimas secretadas são endo e exopeptidades, principalmente serino proteases, tripsina e quimio-tripsina, que digerem a proteína no lúmen intestinal e na borda dos enterócitos (Bonelli et al., 2020; Holtof et al., 2019) (**Figura** 5).

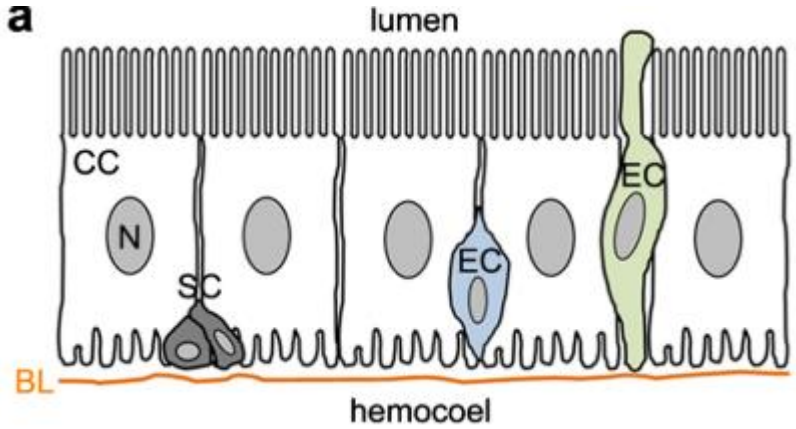


Figura 5. Representação esquemática dos tipos celulares do epitélio do intestino médio de insetos. Lumen: Lúmen; Hemocoel: Hemocelo; CC: Célula colunar; SC: Células-tronco; EC: Células endócrinas. Adaptado: (Caccia; Casartelli; Tettamanti, 2019).

Os produtos da lise proteica são aminoácidos livres e pequenos peptídeos, que serão absorvidos através de transportadores situados na membrana apical dos enterócitos (Chakrabarti; Deamer, 1994). Entretanto, ainda haverá uma pequena fração proteica que será absorvida por transportadores catiônicos e íon dependentes durante a passagem pelo intestino posterior (Miguel-Aliaga; Jasper; Lemaitre, 2018). Independentemente do local e da forma de absorção, os aminoácidos e peptídeos seguem para a hemolinfa (Holtof et al., 2019).

Uma vez absorvidos, os aminoácidos serão distribuídos através da hemolinfa e utilizados pelo metabolismo para a síntese proteica e na formação de órgãos importantes (Brogan et al., 2021). Quando a larva atinge a fase L_6 ela se transforma em pupa e realiza a metamorfose, a reserva proteica é utilizada para síntese de proteínas diferenciadas, úteis para a fase adulta (Zhang et al., 2024).

Durante o processo de consumo ativo larval, os nutrientes consumidos, porém, não digeridos são excretados pelo ânus, formando as fezes. Portanto, as fezes são fontes importantes de resíduos nitrogenados "N" que compõem o *frass*. Além disso, o N absorvido que se encontra em excesso no organismo será excretado de diferentes formas (Ip; Chew, 2018). As LMSN pertencem a ordem Diptera e excretam o ácido úrico como principal forma nitrogenada. Existem insetos desta mesma ordem, que além de excretarem ácido úrico, excretam ureia na fase larval e pupal (Bursell, 1967). O ácido úrico excretado irá enriquecer com fonte adicional nitrogenada o biofertilizante *frass* (Jasso et al., 2023).

O *frass* é um coproduto resultante do processo de alimentação/digestão das larvas, composto pelos resíduos de alimentos não digeridos, fezes, larvas mortas e exúvias. Este coproduto apresenta interesse comercial podendo ser utilizado como biofertilizante e, até mesmo, como alimento para algumas espécies animais (Meneguz et al., 2018; Lalander et al., 2020; Hopkins et al., 2021; Guidini Lopes et al., 2023)

Embora o *frass* apresente interesse comercial pelo conteúdo nitrogenado, aumentos na sua produção, bem como na concentração nitrogenada, são reflexos de manejos inadequados do sistema de criação de LMSN (Gärttling; Schulz, 2022). Refletem desequilíbrio no balanço de nitrogênio do sistema, que deve preconizar a retenção do N dietético na larva, preferencialmente. Enquanto os teores de N no *frass* e N perdido devem ser evitados, pois indicam que o nitrogênio que deveria ser absorvido pela larva, está ficando retido no *frass* ou

perdido, de forma a causar contaminação ambiental (Beesigamukama et al., 2020; Arabzadeh et al., 2022).

2.2.5 Exigência nutricional – Animais domésticos x insetos

Exigência nutricional está relacionada à quantidade de nutriente que deve ser ofertada na dieta a fim de suprir as necessidades que garantam a mantença e a produção (Sakomura, *et al*., 2016). A exigência nutricional de animais domésticos é um tópico já bem estabelecido pela nutrição animal.

A determinação de exigência em animais domésticos tem como base, a categoria de produção do animal, isto é, em que momento fisiológico de produção o animal se encontra, podendo ser: mantença, crescimento, engorda e reprodução. Cada fase possuí diferentes necessidades metabólicas para que atinja o máximo de sua capacidade produtiva (Rostagno *et al*., 2024; FEDIAF, 2024).

Os animais de produção que no final de cadeia, destinam-se ao abate, possuem informações mais precisas quanto às suas exigências. Isto se deve a natureza do sistema produtivo, que por sua vez, se ajusta a um dos métodos de determinação de exigência nutricional.

Os métodos de determinação de exigências nutricionais são bem estabelecidos nos animais domésticos, para todas as suas categorias. No método dose-resposta são utilizadas rações formuladas com diferentes teores do nutriente a ser testado. Estas dietas podem ser formuladas para serem isonutricionais, alterando-se somente o nutriente teste. Como exemplo temos a utilização de aminoácidos purificados utilizados para determinação de exigências aminoacídicas em suínos. Ou podem ser realizadas dietas com diferentes inclusões do nutriente a ser testado através do método de adição de aminoácido puro, dessa forma, terão 2 controles: Negativo (Sem a utilização de aminoácido puro) e controle positivo (Somente com aminoácido puro). Procedimento regularmente utilizado na suinocultura para determinação de teor proteico dietético ideal, em que se utiliza amido como controle negativo da dieta (Sakomura, *et al*., 2016).

A variável resposta é o ganho de peso do animal em função da elevação dos teores do nutriente testado. Havendo necessariamente o abate de indivíduos ao longo do crescimento. A dose ideal da adição do nutriente poderá ser observada visualmente por meio de gráficos. O aumento da variável resposta será observável até atingir o ponto de inflexão da curva, que representará o teor ideal de inclusão do nutriente. Ao chegar no platô de resposta da inclusão do nutriente, já não há mais efeito do aumento do teor de nutriente sobre a variável resposta. Porém, caso ele avance o platô da curva, passará a entrar na zona de intoxicação (Souza; Malheiros; Carneiro, 2014).

O modelo de experimentação fatorial permite modelar o contexto experimental no qual o animal está incluso, podendo explicar as alterações no metabolismo, além de corrigir fatores ambientais, o que o difere do método dose resposta, por não considerar tais interações (Talpaz *et al.*, 1986). Este método não requer que ocorra o abate dos animais. Porém, como desvantagem, o método fatorial considera um animal ou um grupo de animais, a depender do protocolo utilizado, como a média populacional. Sendo os animais selecionados ao acaso de forma representativa para a população, caso contrário o resultado poderá ser enviesado (Hauschild; Pomar; Lovatto, 2010; Aguilar; Mourão; Cyrino, 2021).

Neste método, utiliza-se a equação (1), a fim de determinar o balanço de nitrogênio do animal

Equação (1)

$$BN = Coeficiente\ de\ digestibilidade\ proteíca * \mathrm{NI} + NE$$

Em que: BN: Balanço de nitrogênio; NI: Nitrogênio ingerido e NE: Nitrogênio excretado

No qual o nitrogênio de mantença será determinado quando o intercepto Y for igual a zero, isto é, quando o animal não tem ganho nem perda de nitrogênio. Quando o intercepto X é zerado, ele representará a perda endógena de nitrogênio (Sakomura e Rostagno, 2016; Amorim et al., 2020). Entretanto, este método não é aplicável em LMSN, pois ainda não existem técnicas que permitam a determinação exata do nitrogênio excretado por indivíduo.

Outro procedimento são os ensaios de coleta total de fezes em gaiolas metabólicas, que não precisam da realização do abate. Cada animal representa uma unidade experimental e todos passarão por um período de adaptação às dietas testes. No experimento, sabe-se exatamente a quantidade do nutriente teste que o animal ingere e, através da coleta das excretas, será possível determinar o quanto do nutriente foi excretado. Neste caso, deve-se considerar a categoria dos animais. Entretanto, este método também não é possível de ser realizado com a LMSN, pois nas caixas de criação, não é possível separar o que foi consumido do excretado (Cheng; Chiu; Lo, 2017).

A experimentação de exigência nutricional da LMSN apresenta lacunas, uma vez que as fases de criação não estão bem definidas nos artigos, bem como faltam informações de condições experimentais (Bosch et al., 2020a). Estudos demonstraram que o teor médio proteico dietético no substrato de alimentação está entre 15 e 19% de PB na matéria seca (Schneider et al., 2025a, 2025b). Contudo, não definem claramente a fase metabólica que a larva se encontra, isto é, seu instar. Portanto, este teor pode ter variações, isto porque, há a possibilidade de variações nas exigências nutricionais de acordo com as fases de "cria" e "recria". Assim como é observado na produção de animais domésticos, em que os animais na fase de "cria" necessitam de maior aporte proteico em suas dietas, a fim de expressar seu máximo desempenho na fase de maior ganho (Resende et al., 2008).

Tentativas de determinação da exigência nutricional em proteína bruta na LMSN foram realizadas. Utilizando-se larvas de 6 dias de idade, foram estabelecidas a relação proteína:carboidrato por meio de dietas semi-purificadas (Oddon; Biasato; Gasco, 2022; Eggink; Donoso; Dalsgaard, 2023). Adicionalmente, quanto à alimentação da LMSN, estudos descrevem diferentes dietas sendo comparadas entre si sem a descrição da composição centesimal e com o uso de diferentes ingredientes. O que por sua vez, certamente poderá causar alterações na digestibilidade dos nutrientes, consequentemente, nos índices produtivos das LMSN (Hopkins et al., 2021; Guidini Lopes et al., 2023; Pradabphetrat; Sathawong; Pimsen, 2024).

Nos estudos de nutrição animal com criação de animais domésticos tradicionais, a conversão alimentar é utilizada para avaliar a capacidade do animal em converter 1kg de alimento em produto de origem animal (Sakomura & Rostagno, 2016). Ressalta-se que para a determinação da conversão alimentar é necessário quantificar precisamente o consumo em matéria seca do alimento pelo animal (Araujo & Zenetti, 2019). Entretanto, quantificar essa informação na produção de insetos é desafiador. Isto porque, na produção de LMSN especificamente, não há metodologia disponível para quantificar e separar os excrementos do alimento não consumido pelas larvas (Bosch et al., 2020a; Fowles; Nansen, 2020). Desta forma, a fim de mensurar a capacidade da larva de transformar o substrato em biomassa larval, utiliza-se a bioconversão, que se baseia na massa inicial de alimento e a massa larval ou de *frass*, produzida ao final do ciclo.

A experimentação com a utilização de dietas padronizadas a base de substrato pré consumo humano ainda é escassa na produção de LMSN. Principalmente devido à dificuldade de trabalhar com este ingrediente, pois sua composição nutricional é variável (Spranghers et al., 2017; Hosseindoust et al., 2023). Além disso, há a falta de utilização de conceitos zootécnicos de produção, aplicados à produção deste inseto. Estudos utilizam principalmente como variáveis respostas a massa larval produzida *in natura*, o peso médio larval e a bioconversão. Entretanto, existem diferentes formas de se calcular a bioconversão. Exigindo dos pesquisadores e leitores a necessidade de atentar-se quanto a equação utilizada, para não comparar entre si, resultados obtidos por diferentes modelos.

De acordo com Rehman et al., 2017, a seguinte equação (Equação 2) com base na matéria seca:

Equação 2

$$BC(\%) = \left(\frac{Massa\ larval_{MS}}{Massa\ inicial\ do\ substrato_{\ MS}}\right) \times 100$$

Onde: BC (%) = bioconversão em matéria seca (MS); Massa Larval $_{MS}$ = Massa total das larvas em grama ou kg na MS; Massa inicial do substrato $_{MS}$ = massa inicial de substrato em gramas ou kg na MS oferecido as larvas.

Tal cálculo de bioconversão é eficiente quando aplicada à fase de "cria". Isto porque, não há a necessidade de descontar o peso inicial larval, pois são os ovos que são postos sobre o substrato. Assim, a massa de ovos inicial torna-se irrelevante ao final desta fase de criação.

As equações a seguir são aplicáveis à fase de "recria". Segundo Ebeneezar et al. (2021), (Equação 3) consideram na equação a massa larval inicial, logo, pode ser aplicada para sistemas de criações em que há a inserção de larvas já desenvolvidas sobre os substratos. Tal padrão de criação é adotado em muitas indústrias, a fim de melhor controle populacional e nutritivo dos animais (Barrett et al., 2023).

Equação 3

$$EB(\%) = \left(\frac{Massa\ larval_{Final\ MS} - Massa\ larval_{inicial\ MS}}{Massa\ inicial\ do\ substrato\ _{MS}}\right) \times 100$$

Onde: EB (%) = eficiência de bioconversão em MS; Massa Larval $_{\text{inicial MS}}$ = Massa larval no final da "cria" em gramas ou kg na MS; Massa Larval $_{\text{final MS}}$ = massa larval na saída da "recria" em grama ou kg na MS; Massa inicial do substrato $_{MS}$ = massa inicial de substrato em gramas ou kg na MS oferecido as larvas.

Por fim, Bosch et al., (2020) (Equação 4) consideram outros elementos que podem ser relevantes a depender do objetivo do estudo. Utilizam a massa do *frass*, isto é, o resíduo de alimento não aproveitado pelas LMSN, exúvias e larvas mortas (Fowles; Nansen, 2020; Ojha; Bußler; Schlüter, 2020). Considerada com superior precisão quanto a quantidade de substrato que efetivamente foi aproveitado pela LMSN.

Equação 4

$$EBC(\%) = \left(\frac{Massa\ larval\ _{FinalMS} - Massa\ larval\ _{inicialMS}}{Massa\ inicial\ do\ substrato_{MS} - Massa\ do frass_{MS}}\right) \times 100$$

Onde: EBC (%) = Eficiência de bioconversão corrigida para resíduo; Massa Larval inicial MS = Massa larval no final da "cria" em gramas ou kg na MS; Massa Larval final MS = massa larval na saída da "recria" em grama ou kg na MS; Massa inicial do substrato = massa inicial de substrato em gramas ou kg na MS oferecido as larvas; Massa do *frass* MS = massa de *frass* quantificado após separar as larvas do substrato em gramas ou kg na MS.

Todas as equações podem ser aplicadas à experimentação com LMSN, entretanto, deve-se compreender as suas aplicações e limitações, a fim de evitar confusão aos leitores e na comparação de dados entre os artigos.

2.2.6 Viabilidade de aplicação de métodos experimentais tradicionais em LMSN

Há necessidade de ajustes das técnicas tradicionais para que sejam aplicadas nos estudos com LMSN. Até mesmo o desenvolvimento de novos protocolos e interpretações. Existem dificuldades experimentais inerentes ao sistema de criação de insetos, tal como o manuseio do substrato e dos animais ali inseridos, podendo causar mortalidade (Bosch et al., 2020).

A determinação do balanço de nitrogênio está relacionada aos estudos de exigência em proteína, contudo, neste caso, há necessidade de adaptação experimental com LMSN. Pelo método tradicional é necessário controlar a quantidade consumida e excretada (Furtado et al., 2020). Porém, a larva se desenvolve imersa no substrato que consome, impedindo a determinação precisa do nutriente consumido. Além disso, suas exúvias e excretas são eliminadas sobre o mesmo alimento, misturando-se impedindo que haja a coleta das excretas. Perdas nitrogenadas adicionais ainda não são eficientemente consideradas na experimentação com LMSN, como a volatilização de nitrogênio (Qin et al., 2022). Além disso, há a possibilidade de ocorrer entrada de nitrogênio na caixa de criação, através de bactérias fixadoras de nitrogênio (Jesus et al., 2025), isto é mais observado em substratos com menor teor proteico. Perdas nitrogenadas foram estudadas em solos e a quantificação do nitrogênio volatilizado pode ser adaptado com técnicas já desenvolvidas (Dos Santos et al., 2022; Jasso et al., 2023). Martins *et al*., (2021) sugerem a coleta do nitrogênio volatilizado por meio de aparato contendo solução ácida (H_2SO_4).

Desta forma, o controle do N ofertado (g de N/Kg de MS) deve ser feito por meio da quantificação precisa do N dietético. Determinando-se o %N no alimento e a quantidade de alimento ofertado na MS. Em seguida, após o término do ciclo, as massas de larva e *frass* devem ser quantificadas em MS para a determinação do conteúdo em %N retido. Por meio da diferença entre o N que entrou no sistema pela soma dos conteúdos de N retidos, determina-se o N perdido (Smets; Claes; Van Der Borght, 2021).

Adicionalmente, existem duas possibilidades quanto ao resultado do cálculo final do balanço de N, que pode ser positivo ou negativo. Nos casos experimentais que os valores são positivos, isto é, há aumento do N inserido no sistema. Isto pode ocorrer devido a fixação de nitrogênio realizada por bactérias, causada pelo aumento da diversidade microbiana local, devido às condições favoráveis da relação C:N (Zhao et al., 2023; Jesus et al., 2025). No caso negativo, perdas nitrogenadas por volatilização estão ocorrendo e o sistema se configura como menos eficiente, a captação do nitrogênio volatilizado é complexa, pois não se pode cobrir a caixa de criação, devido a alteração na ventilação e até mesmo na temperatura.

Sugere-se adaptação da metodologia, para determinação do BN para a produção de LMSN. Através da realização da captura do N volatilizado, através da técnica proposta por Martins et al. (2021) para estudo de volatilização de N em solos, que ao ser adaptada para insetos permitirá quantificar parte do nitrogênio volatilizado. Porém, é possível que a adaptação

dessa técnica apresente problemas, promoverá redução da circulação de ar, interferindo na cinética de secagem (Lalander et al., 2020b) e oportunizando fugas devido a condensação de água nas paredes da caixa

Outra técnica que requer adaptação é a diluição de dietas, pois, em experimentos que utilizam substratos alimentares provenientes de resíduos pré-consumo humano, geralmente há dificuldade em realizar diluições experimentais voltadas à redução da concentração de um nutriente específico. Pois ao inserir outros ingredientes, a textura do substrato pode ser alterada, de modo a afetar a mobilidade das larvas e o aproveitamento em função da modificação da estrutura do substrato (Hosseindoust et al., 2023).

A utilização da técnica de diluição de nutrientes através da inclusão de amido, pode alterar a mobilidade larval na caixa de produção. O amido cru é alimento insolúvel e pouco higroscópico, portanto, ele precipita e compacta no fundo da caixa de criação e torna-se inacessível para a LMSN. A utilização do amido não evitaria a formação da lâmina d'água sobre o substrato, o que por sua vez, potencializa o afogamento larval, principalmente de larvas L_1. Além disso, dificulta no aproveitamento do substrato (Meneguz et al., 2018; Guidini Lopes et al., 2023). Devendo-se, portanto, associar outros ingredientes ao amido, como sugestão observamos excelente efeito da fibra da casca do coco moída, por apresentar capacidade de adsorção de água, baixa digestibilidade e melhorar a estrutura do substrato (Dados de equipe não publicados).

2.2.7 Enzimas digestivas proteolíticas da LMSN

Em condições naturais, a matéria orgânica em decomposição é o substrato que fornecerá os nutrientes para a LMSN, que por sua vez, contém alta carga microbiana (Bruno et al., 2025). Trata-se de um processo de co-conversão entre microrganismos e a larva do inseto (Shao et al., 2024; Wang et al., 2024). Os nutrientes disponíveis são consumidos pelos microrganismos que, consequentemente, podem alterar o perfil proteico do substrato em decomposição. A proteína microbiana aumenta e é mais disponível para as LMSN (Shao et al., 2024).

A expressão e a atividade enzimática estão associadas à alimentação e iniciam-se quando o ovo eclode. Neste primeiro momento, as larvas L_1 alimentam-se de microrganismos e dos alimentos de reduzido tamanho de partícula ou nutrientes solúveis (Lievens et al., 2023). Apesar da funcionalidade do aparelho bucal, logo após a eclosão, as suas dimensões são limitadas, com aproximadamente 20 μm com 5 dias, atingindo até 110μm aos 17 dias após eclosão (Bruno et al., 2025b). E ao atingir a fase de adulta, como mosca, o aparelho bucal se torna esponjoso e somente capaz de consumir alimentos líquidos, tais como a água e nutrientes nela solubilizados (Bruno et al., 2019b). Portanto, nas primeiras horas após a eclosão a presença de microrganismos como alimento e dos nutrientes solúveis garantem o suprimento das necessidades nutricionais. Conforme cresce, a larva passa a alimentar-se do substrato sólido úmido (Bruno et al., 2020).

O trato gastrointestinal das LMSN é um ambiente de elevada complexidade adaptativa, pois esse inseto pode se alimentar de diversas fontes de matéria orgânica em decomposição. Logo, a microbiota intestinal bem como a produção enzimática se ajusta ao tipo de substrato para remover dele o máximo de nutrientes possíveis (Bruno et al., 2019b).

Na natureza, após emergir do ovo, a larva passa a se alimentar do substrato nutricional próximo. Sendo este, seu único substrato alimentar enquanto larva e, nele, ocorrerá adaptação microbiana e modulação enzimática, a fim de ter melhor aproveitamento do substrato nutricional (Schreven et al., 2022). Por não haver alteração do substrato alimentar, não há outra adaptação enzimática imposta pela troca de substrato (Izadi, 2025).

Este comportamento adaptativo deve ser considerado na produção industrial da LMSN, pois consideram a criação em "ciclo duplo", isto é, com dois momentos de alimentação. Ao utilizarem duas dietas distintas, para cada momento de criação, com diferentes composições nutricionais e de ingredientes, podem afetar a modulação enzimática do intestino da LMSN. Ocasionando um momento adaptativo, em que o consumo irá se manter, entretanto, sem que ocorra o melhor aproveitamento dos nutrientes (Dar et al., 2024).

O intestino da LMSN apresenta divisões, caracterizadas pela alteração de células epitéliais, pH e carga microbiana. Sendo o intestino médio o local onde ocorre as principais modulações bacterianas e enzimáticas. Na porção anterior do intestino médio o pH 6, próximo da neutralidade, proporciona superior diversidade microbiana o que favorece a manutenção de um microbioma generalista, porém, ainda com capacidade adaptativa ao substrato alimentar. Na porção medial do intestino médio, ocorre uma diminuição para pH 2, restringindo a população de microrganismos e ocorre queda na carga microbiana do alimento. Principalmente, nesta porção intestinal, a população microbiana se especializa em degradar um tipo específico de substrato. Por fim, no segmento posterior do intestino médio o pH torna-se alcalino próximo 8,5. Deste ponto em diante, a carga microbiana eleva-se, entretanto, com menor número de espécies, logo trata-se de uma população restrita e especializada, devido a toda seleção que teve que passar durante o processo de digestão através do intestino da LMSN (Bruno et al., 2019a, 2019b, 2025).

A diversidade microbiana mencionada altera-se conforme o substrato em que o animal está inserido. Em substratos de composições complexas assim como o resíduo pré-consumo humano (RPCH) a variação é enorme, podendo conter: arroz, feijão, macarrão, frutas, legumes, verduras etc. assim a diversidade microbiana eleva-se (Bonelli et al., 2020). Segundo Bruno et al., (2019a), substratos compostos exclusivamente por vegetais, exibem menor diversidade microbiana, porém especializam-se mais rapidamente quando comparado com dietas que apresentam composição diversificada, apresentando folhas, frutos, farelos, grãos etc. Fato observado em seu estudo, no qual a LMSN apresentou crescimento de uma população específica de bactérias, para o substrato alimentar: mix de vegetais e uma população mais diversa para dieta "Gainesville" e dieta a base de farinha de peixe.

Desconhece-se quais são os teores proteicos que saturam a expressão/produção enzimática da LMSN. Não há estudos que determinam a atividade proteolítica pela LMSN. Sabendo em qual teor proteico ocorre a saturação da expressão enzimática proteolítica, é possível prevenir o excesso de proteína dietética, com consequente redução da perda de nitrogênio (De Filippis et al., 2023; Zhao et al., 2025; Lee et al., 2026).

Segundo Wakuda et al., (2024), existem três tipos de proteases descritas no intestino da LMSN, sendo elas as tripsinas, cisteínas proteases e proteases aspárticas. Dentre elas, as tripsinas são as mais abundantes. A tripsina realiza ativação da cascata enzimática, ativando endo e exopeptidases para digestão proteica, além de se autorregular (Li et al., 2022). A expressão de serino proteases foi determinada em LMSN quando submetidas a substratos de diferentes composições bromatológicas e, possivelmente de texturas, o que influenciou na expressão destas proteínas e nos índices produtivos da LMSN (Wakuda et al., 2024). Não existem estudos que tenham feito uso do RPCH como ingrediente em todos os tratamentos experimentais para ensaios enzimáticos.

A utilização do RPCH na alimentação da LMSN, não apresenta padronização dos ingredientes que o compõe, impactando na experimentação com este inseto. Entretanto, sabe-se que há a presença de grãos e legumes nesta mistura. Os grãos e legumes por sua vez, podem apresentar inibidores de proteases, como inibidores de Bowman-Birk e Kunitz, que são

responsáveis por reduzir a atividade proteolítica do trato digestivo (Bonturi et al., 2022; Kårlund et al., 2021). Não há estudos que demonstram a alteração da atividade enzimática por conta da inclusão de RPCH nas dietas de LMSN.

2.3 CONCLUSÕES

Observa-se que os avanços na compreensão dos aspectos biológicos e metabólicos das larvas de *Hermetia illucens* têm sido fundamentais para o aprimoramento técnico. A consolidação do conhecimento permite otimizar as condições experimentais e os sistemas produtivos, especialmente no que tange à precisão dos teores de proteína bruta dietética necessários para o desenvolvimento larval. Existem recomendações de teores de proteína dietética adequadas, com 19% para larvas de 6 dias e 15% para 10 dias. Com o avanço dos trabalhos, estão surgindo estudos que apresentam uniformidade quanto aos aspectos físico-químicos das dietas e que apontam variáveis zootécnicas importantes para o avanço da produção, como a bioconversão. Entretanto, não há consenso quanto a forma de cálculo deste indicador de produção. Existem estudos delineados para a determinação da exigência de proteína bruta da LSMN, entretanto, não se baseiam na utilização de RPCH como substrato de alimentação.

A determinação do impacto da produção de LMSN com duas alimentações, na modulação enzimática ainda não foi determinada. Contudo, sabe-se que a inserção de um novo ingrediente na dieta da LMSN requer período de adaptação. Ainda não é possível afirmar que a utilização dos sistemas de duas alimentações seja melhor que o de alimentação única, para os índices produtivos e expressão enzimática, pois não há estudos que tenham comparado os sistemas.

2.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM, T. R. *et al.* Nitrogen metabolism and protein requirements for maintenance of growing Red Norte bulls. **Animal**, v. 14, n. 4, p. 763–770, 2020.

AMRUL, Nur Fardilla *et al.* A Review of Organic Waste Treatment Using Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*). **Sustainability (Switzerland)**, v. 14, n. 8, 1 abr. 2022.

ARABZADEH, Ghazaleh *et al.* Diet Composition Influences Growth Performance, Bioconversion of Black Soldier Fly Larvae: Agronomic Value and In Vitro Biofungicidal Activity of Derived *Frass*. **Agronomy**, v. 12, n. 8, p. 1765, 27 jul. 2022.

ARAUJO, L. F; ZANETTI, M. A. Nutrição Animal. 1. ed. Barueri: Manole, 2019. v. 1. 355p

ARRESE, Estela L.; SOULAGES, Jose L. Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation. **Annual Review of Entomology**, v. 55, n. 1, p. 207–225, 1 jan. 2010.

BARRETT, M. *et al.* Welfare considerations for farming black soldier flies, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae): a model for the insects as food and feed industry. **Journal of Insects as Food and Feed**, v. 9, n. 2, p. 119–148, 2023.

BARROS-CORDEIRO, Karine Brenda; BÁO, Sônia Nair; PUJOL-LUZ, José Roberto**.** Intra-puparial development of the black soldier-fly, *Hermetia illucens*. **Journal of Insect Science.** 2014

BEESIGAMUKAMA, Dennis *et al.* Exploring Black Soldier Fly *Frass* as Novel Fertilizer for Improved Growth, Yield, and Nitrogen Use Efficiency of Maize Under Field Conditions. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, 23 set. 2020.

BEKKER, Nicolai Sundgaard *et al.* Impact of substrate moisture content on growth and metabolic performance of black soldier fly larvae. **Waste Management**, v. 127, p. 73–79, 15 maio 2021.

BONELLI, Marco *et al.* Black Soldier Fly Larvae Adapt to Different Food Substrates through Morphological and Functional Responses of the Midgut. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 14, p. 4955, 13 jul. 2020.

BOSCH, G. *et al.* Standardisation of quantitative resource conversion studies with black soldier fly larvae. **Journal of Insects as Food and Feed**, v. 6, n. 2, p. 95–109, 8 abr. 2020.

BRASIL. Ofício Circular nº 33. MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento o. 6, 2023.

BROECKX, Laurens *et al.* Growth of black soldier fly larvae reared on organic side-streams. **Sustainability (Switzerland)**, v. 13, n. 23, 1 dez. 2021.

BROGAN, Emily N. *et al.* Characterization of protein in cricket (Acheta domesticus), locust (Locusta migratoria), and silk worm pupae (Bombyx mori) insect powders. **LWT**, v. 152, 1 dez. 2021.

BRUNO, D. *et al.* Review: A journey into the black soldier fly digestive system: From current knowledge to applied perspectives. **animal**, p. 101483, mar. 2025.

BRUNO, Daniele *et al.* An in-depth description of head morphology and mouthparts in larvae of the black soldier fly *Hermetia illucens*. **Arthropod Structure and Development**, v. 58, 1 set. 2020.

BRUNO, Daniele *et al.* The Intestinal Microbiota of *Hermetia illucens* Larvae Is Affected by Diet and Shows a Diverse Composition in the Different Midgut Regions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 85, n. 2, 15 jan. 2019.

BURSELL, E. **The Excretion of Nitrogen in Insects**. *[S.l.: S.n.]*. 1967.

CACCIA, Silvia; CASARTELLI, Morena; TETTAMANTI, Gianluca. The amazing complexity of insect midgut cells: types, peculiarities, and functions. **Cell and Tissue Research**, v. 377, n. 3, p. 505–525, 29 set. 2019.

CHAKRABARTI, Ajoy C.; DEAMER, David W. Permeation of Membranes by the Neutral Form of Amino Acids and Peptides: Relevance to the Origin of Peptide Translocation. **Journal of Molecular Evolution**, v. 39, p. 1–5, 1994.

CHIA, Shaphan Yong *et al.* Threshold temperatures and thermal requirements of black soldier fly *Hermetia illucens*: Implications for mass production. **PLoS ONE**, v. 13, n. 11, 1 nov. 2018.

DE FILIPPIS, Francesca *et al.* Plastics shape the black soldier fly larvae gut microbiome and select for biodegrading functions. **Microbiome**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2023.

DE SMET, Jeroen *et al.* Microbial Community Dynamics during Rearing of Black Soldier Fly Larvae (*Hermetia illucens*) and Impact on Exploitation Potential. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 9, maio 2018.

DILELIS, F. *et al.* Low-level inclusion of full-fat black soldier fly larvae meal as a functional ingredient in broiler diets. **Journal of Insects as Food and Feed**, p. 1–12, 13 ago. 2025.

DOS SANTOS, Neiri J. A. *et al.* Performance, Digestibility, Nitrogen Balance and Ingestive Behavior of Young Feedlot Bulls Supplemented with Palm Kernel Oil. **Animals**, v. 12, n. 4, p. 429, 11 fev. 2022.

DUBREUIL, Ronald R. Copper cells and stomach acid secretion in the Drosophila midgut. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, n. 5, p. 742–752, maio 2004.

EBENEEZAR, Sanal *et al.* Nutritional evaluation, bioconversion performance and phylogenetic assessment of black soldier fly (*Hermetia illucens*, Linn. 1758) larvae valorized from food waste. **Environmental Technology & Innovation**, v. 23, p. 101783, ago. 2021.

EGGINK, K. M.; DONOSO, I. G.; DALSGAARD, J. Optimal dietary protein to carbohydrate ratio for black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. **Journal of Insects as Food and Feed**, v. 9, n. 6, p. 789–798, 26 maio 2023.

EKE, Maurielle *et al.* Deciphering the functional diversity of the gut microbiota of the black soldier fly (*Hermetia illucens*): recent advances and future challenges. **Animal Microbiome**, v. 5, n. 1, p. 40, 31 ago. 2023.

FEDIAF. Nutritional guidelines for complete and complementary pet food for cats and dogs. Belgica: Bruxelas (2021)

FOWLES, Trevor M.; NANSEN, Christian. Insect-Based Bioconversion: Value from Food Waste. *In*: **Food Waste Management**. Cham: Springer International Publishing, 2020. p. 321–346.

FRANCIS, Aditya; SCHMITT, Eric; SMETANA, Sergiy. Making better Bugs: Improving black soldier fly production for a more sustainable future. **Journal of Cleaner Production**, v. 521, p. 146240, ago. 2025.

FREEL, Tarra A.; MCCOMB, Alejandra; KOUTSOS, Elizabeth A. Digestibility and safety of dry black soldier fly larvae meal and black soldier fly larvae oil in dogs. **Journal of Animal Science**, v. 99, n. 3, 1 mar. 2021.

FURTADO, Rafael Nogueira *et al.* Intake, digestibility and nitrogen balance in sheep fed diets containing detoxified castor cake. **Revista ciência agronômica**, v. 51, n. 1, 2020.

GÄRTTLING, Daniel; SCHULZ, Hannes. Compilation of Black Soldier Fly *Frass* Analyses. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 22, n. 1, p. 937–943, 1 mar. 2022.

GIANNETTI, Daniele *et al.* Do It by Yourself: Larval Locomotion in the Black Soldier Fly *Hermetia illucens*, with a Novel "Self-Harvesting" Method to Separate Prepupae. **Insects**, v. 13, n. 2, 1 fev. 2022.

GLIGORESCU, Anton *et al.* Development, growth and metabolic rate of *Hermetia illucens* larvae. **Journal of Applied Entomology**, v. 143, n. 8, p. 875–881, 19 set. 2019.

GUIDINI LOPES, Ivã *et al.* Dynamics of black soldier fly larvae composting – Impact of substrate properties and rearing conditions on process efficiency. **Waste Management**, v. 172, p. 25–32, 1 dez. 2023.

HAUSCHILD, L.; POMAR, C.; LOVATTO, P. A. Systematic comparison of the empirical and factorial methods used to estimate the nutrient requirements of growing pigs. **Animal**, v. 4, n. 5, p. 714–723, 2010.

HOLTOF, Michiel *et al.* Extracellular nutrient digestion and absorption in the insect gut. **Cell and Tissue Research** Springer Verlag , 1 set. 2019.

HOPKINS, Indee *et al.* The influence of food waste rearing substrates on black soldier fly larvae protein composition: A systematic review. **Insects** MDPI AG, , 1 jul. 2021.

HOSSEINDOUST, Abdolreza *et al.* Quality Characteristics of Black Soldier Flies Produced by Different Substrates. **Insects**, v. 14, n. 6, 1 jun. 2023.

IMPERATRIZ-FONSECA, Vera Lucia; NUNES-SILVA, Patrícia. As abelhas, os serviços ecossistêmicos e o Código Florestal Brasileiro. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 4, p. 59–62, dez. 2010.

IP, Yuen K.; CHEW, Shit F. Air-breathing and excretory nitrogen metabolism in fishes. **Acta Histochemica**, v. 120, n. 7, p. 680–690, out. 2018.

JASSO, Beatrice *et al.* Black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) *frass* and sheddings as a compost ingredient. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 7, 2023.

KIM, Wontae *et al.* Biochemical characterization of digestive enzymes in the black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 14, n. 1, p. 11–14, mar. 2011.

LALANDER, Cecilia *et al.* Process efficiency and ventilation requirement in black soldier fly larvae composting of substrates with high water content. **Science of the Total Environment**, v. 729, 10 ago. 2020.

LEE, Kwang Pum *et al.* Lifespan and reproduction in *Drosophila* : New insights from nutritional geometry. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 7, p. 2498–2503, 19 fev. 2008.

LENI, Giulia; CALIGIANI, Augusta; SFORZA, Stefano. Killing method affects the browning and the quality of the protein fraction of Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) prepupae: a metabolomics and proteomic insight. **Food Research International**, v. 115, p. 116–125, 1 jan. 2019.

LIEVENS, Siebe *et al.* Ingestion and excretion dynamics of microplastics by black soldier fly larvae and correlation with mouth opening size. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, 1 dez. 2023.

MAKKAR, Harinder P. S. *et al.* State-of-the-art on use of insects as animal feed. **Animal Feed Science and Technology**, v. 197, p. 1–33, nov. 2014.

MARTINS, Márcio R. *et al.* A simple and easy method to measure ammonia volatilization: Accuracy under field conditions. **Pedosphere**, v. 31, n. 2, p. 255–264, abr. 2021.

MENEGUZ, Marco *et al.* Effect of rearing substrate on growth performance, waste reduction efficiency and chemical composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 15, p. 5776–5784, 1 dez. 2018.

MIGUEL-ALIAGA, Irene; JASPER, Heinrich; LEMAITRE, Bruno. Anatomy and Physiology of the Digestive Tract of Drosophila melanogaster. **Genetics**, v. 210, n. 2, p. 357–396, 1 out. 2018.

NAKAMURA, Satoshi *et al.* Small-scale rearing of the black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae), in the laboratory: low-cost and year-round rearing. **Applied Entomology and Zoology**, v. 51, n. 1, p. 161–166, 12 fev. 2016.

ODDON, Sara Bellezza *et al.* Black soldier fly life history traits can be influenced by isonutrient-waste-based diets. **Italian Journal of Animal Science**, v. 23, n. 1, p. 331–341, 2024.

ODDON, Sara Bellezza; BIASATO, Ilaria; GASCO, Laura. Isoenergetic-practical and semi-purified diets for protein requirement determination in *Hermetia illucens* larvae: consequences on life history traits. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 13, n. 1, 1 dez. 2022.

OGELLO, Erick O. *et al.* Optimizing Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) production: effects of substrate variation on biomass, nutritional quality, hatchability, fecundity, and *frass* quality. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 9, 2025.

OJHA, Shikha; BUSSLER, Sara; SCHLÜTER, Oliver K. Food waste valorisation and circular economy concepts in insect production and processing. **Waste Management**, v. 118, p. 600–609, dez. 2020.

PLIANTIANGTAM, Nichaphon; CHUNDANG, Pipatpong; KOVITVADHI, Attawit. Growth performance, waste reduction efficiency and nutritional composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae and prepupae reared on coconut endosperm and soybean curd residue with or without supplementation. **Insects**, v. 12, n. 8, 1 ago. 2021.

PRADABPHETRAT, Piyaruk; SATHAWONG, Sidthipong; PIMSEN, Montakarn. Effects of Rearing Black Soldier Fly Larvae (*Hermetia illucens*) from Organic Wastes. **ASEAN Journal of Scientific and Technological Reports**, v. 27, n. 4, p. e252644, 30 jun. 2024.

REHMAN, Kashif ur *et al.* Conversion of mixtures of dairy manure and soybean curd residue by black soldier fly larvae (*Hermetia illucens* L.). **Journal of Cleaner Production**, v. 154, p. 366–373, jun. 2017.

RESENDE, Kleber Tomás de *et al.* Avaliação das exigências nutricionais de pequenos ruminantes pelos sistemas de alimentação recentemente publicados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. spe, p. 161–177, jul. 2008.

ROSTAGNO, H. S. *et al*. Tabelas brasileiras para aves e suínos –composição de alimentos e exigências nutricionais. 5 ed. 2024. Universidade de viçosa.

SAKOMURA, N. K.; ROSTAGNO, H. S. Métodos de pesquisa em nutrição de monogástricos. Jaboticabal, 2 ed. Jaboticabal, FUNEP, 2016

SANTOS, Simone Aparecida dos; VIDIGAL, Pedrina Gonçalves; MERLINI, Luis Sérgio. A criação do Bombyx mori (Bicho-da-seda) e as principais doenças**. Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR**. *[S.l.: S.n.]*.

SCHNEIDER, J. C. Effects of light intensity on mating of the black soldier fly (*Hermetia illucens*, Diptera: Stratiomyidae). **Journal of Insects as Food and Feed**, v. 6, n. 2, p. 111–120, 8 abr. 2020.

SCHNEIDER, Laura *et al.* Dietary Protein Levels in Isoenergetic Diets Affect the Performance, Nutrient Utilization and Retention of Nitrogen and Amino Acids of *Hermetia illucens* (L.) (Diptera: Stratiomyidae) Larvae. **Insects** , v. 16, n. 3, 1 mar. 2025.

SCHREVEN, Stijn J. J. *et al.* Black Soldier Fly Larvae Influence Internal and Substrate Bacterial Community Composition Depending on Substrate Type and Larval Density. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 88, n. 10, 24 maio 2022.

SEYEDALMOOSAVI, Mohammad M. *et al.* Growth efficiency, intestinal biology, and nutrient utilization and requirements of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae compared to monogastric livestock species: a review. **Journal of Animal Science and Biotechnology** BioMed Central Ltd, , 1 dez. 2022.

SHEPPARD, D. Craig *et al.* A value added manure management system using the black soldier flyBioresource**. Technology**. *[S.l.: S.n.]*.

SHEPPARD, D. Craig *et al.* Rearing Methods for the Black Soldier Fly (Diptera: Stratiomyidae). **J. Med. Entomol**. 2002.

SIDDIQUI, Shahida Anusha *et al.* Black soldier fly larvae (BSFL) and their affinity for organic waste processing. **Waste Management** Elsevier Ltd, , 1 mar. 2022.

SIDDIQUI, Shahida Anusha *et al.* Enhancing the bioconversion rate and end products of black soldier fly (BSF) treatment – A comprehensive review. **Environment, Development and Sustainability.** Springer Science and Business Media B.V., 2025.

SILVARAJU, Shaktheeshwari *et al.* Evolution under Domestication: Genetic differentiation in black soldier fly (*Hermetia illucens*) populations subjected to recent selective breeding. **bioRxiv.** 18 abr. 2025.

SIMPSON, Stephen J.; RAUBENHEIMER, David. Macronutrient balance and lifespan. **Aging**, v. 1, n. 10, p. 875–880, 22 out. 2009.

SMETS, Ruben; CLAES, Johan; VAN DER BORGHT, Mik. On the nitrogen content and a robust nitrogen-to-protein conversion factor of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 413, n. 25, p. 6365–6377, 11 out. 2021.

SOUZA, Fernando Augusto de; MALHEIROS, Euclides Braga; CARNEIRO, Paulo Roberto Oliveira. Positioning and number of nutritional levels in dose-response trials to estimate the optimal-level and the adjustment of the models. **Ciência Rural**, v. 44, n. 7, p. 1204–1209, jul. 2014.

SPRANGHERS, Thomas *et al.* Nutritional composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) prepupae reared on different organic waste substrates. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 8, p. 2594–2600, 1 jun. 2017.

TARIQ, Muhammad Raheel *et al.* Black Soldier Fly: A Keystone Species for the Future of Sustainable Waste Management and Nutritional Resource Development: A Review. **Insects** Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 1 ago. 2025.

TOMBERLIN, Jeffery K.; ADLER, Peter H.; MYERS, Heidi M. Development of the black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) in relation to temperature. **Environmental Entomology**, v. 38, n. 3, p. 930–934, jun. 2009.

VIK, Jostein *et al.* Balanced readiness level assessment (BRLa): A tool for exploring new and emerging technologies. **Technological Forecasting and Social Change**, v. 169, p. 120854, ago. 2021.

WANG, Yu Shiang; SHELOMI, Matan. Review of black soldier fly (*Hermetia illucens*) as animal feed and human food. **Foods.** MDPI AG, , 1 out. 2017.

YILDIRIM-AKSOY, Mediha; ELJACK, Rashida; BECK, Benjamin H. Nutritional value of *frass* from black soldier fly larvae, *Hermetia illucens*, in a channel catfish, Ictalurus punctatus, diet. **Aquaculture Nutrition**, v. 26, n. 3, p. 812–819, 30 jun. 2020.

ZHANG, Xin *et al.* Structural, extraction and safety aspects of novel alternative proteins from different sources. **Food Chemistry**, v. 436, p. 137712, mar. 2024.

ZHAO, Shanshan *et al.* Synergistic reshaping of nitrogen flow by black soldier fly and gut ammonia-assimilating bacteria: Green transformation from nitrogenous waste to insect protein. **Environmental Technology and Innovation**, v. 40, 1 nov. 2025.

ZULKIFLI, Nor Fatin Najihah Mohamad *et al.* Nutritional value of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae processed by different methods. **PLoS ONE**, v. 17, n. 2 February, 1 fev. 2022.

CAPÍTULO II

3 CAPÍTULO II – Exigência em proteína bruta de larvas de *Hermetia illucens* em fase de cria alimentadas com resíduo orgânico pré consumo humano e seus impactos sobre os indicadores de produção

RESUMO

A formulação de dietas para a "cria" de larvas de *Hermetia illucens* com resíduo pré-consumo humano (RPCH) tem se mostrado um desafio, devido à falta de padronização nutricional em uma fase crítica da produção. O presente estudo objetiva determinar a exigência de proteína bruta dietética em larvas de mosca soldado negro (LMSN) em dietas compostas por RPCH. Utilizou-se delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema de medidas repetidas: 5x4 (n=6). Os tratamentos foram o teor de proteína bruta dietética (%PB): PB22%, PB19%, PB15%, PB13% e PB6%. O período foi representado pelos dias de ciclo de crescimento na fase de cria, com abates nos dias: D7, D8, D9 e D10. As dietas foram compostas por resíduos orgânico pré-consumo humano (RPCH), amido de milho e fibra de coco. O RPCH foi proveniente de coleta seletiva (Brasil, 2023) e moído para formar um "blend". Os ingredientes foram misturados e hidratados para 83% de umidade. Utilizou-se caixas padrões com 0,2g de ovos e 717g de dieta úmida/repetição. No sétimo dia, realizou-se separação manual das larvas e *frass*, os dados das pesagens foram registrados para efeito de cálculos. Larvas vivas foram separadas para coleta de imagem e determinação do peso vivo. As larvas foram abatidas por imersão em água fervente e, juntamente com o *frass*, foram postas para secagem e determinação da composição nutricional. As variáveis de produção foram analisadas através do software SAS® Studio, utilizando PROC MIXED. Os efeitos de tratamento foram avaliados em contrastes polinomiais de ordem linear e quadrática, com coeficientes ajustados através do PROC IML. Adotou-se alfa igual a 0.05. Observou-se interação significativa na massa larval, bioconversão e nitrogênio larval com respostas lineares para todos os dias. Sete dias de ciclo foram suficientes para garantir o máximo desempenho nas dietas de PB19% e PB22%. Não houve interação significativa para a perda de nitrogênio (%), a qual apresentou resposta quadrática, consequentemente, maiores perdas nitrogenadas foram observadas nas dietas de maiores teores de PB%. Conclui-se que no ciclo de cria por sete dias, dietas compostas por RPCH são viáveis como substrato. E que o aumento do teor de proteína bruta dietética à base de RPCH na fase de cria promove melhora dos índices produtivos em substratos com teores entre 19% e 22% de PB, contudo, o melhor desempenho ocorre em teores de 19%PB, enquanto teores mais elevados, promovem maior perda nitrogenada.

Palavras-chave: Mosca soldado negro, Nitrogênio, Nutrição Animal.

ABSTRACT

Formulating diets for the “growing” phase of *Hermetia illucens* larvae using pre-consumer human food residue (PHFR) has proven challenging due to the lack of nutritional standardization during a critical production stage. This study aimed to determine the dietary crude protein requirement of black soldier fly larvae (BSFL) fed diets composed of PHFW. A completely randomized experimental design with repeated measures was used in a 5x4 factorial arrangement (n=6). Treatments consisted of dietary crude protein levels (%CP): CP22%, CP19%, CP15%, CP13%, and CP6%. The period was represented by the number of days in the growth cycle during the starter phase, with sampling on days D7, D8, D9, and D10. The diets consisted of pre-consumer human organic residues (PCHOR), corn starch, and coconut fiber. The PCHOR was obtained from a selective collection (Brazil, 2023) and ground to form a “blend.” The ingredients were mixed and hydrated to 83% moisture. Standard containers were used with 0.2 g of eggs and 717 g of wet diet per replicate. On the seventh day, larvae and *frass* were manually separated, and the weight data were recorded for calculation. Live larvae were separated for image collection and live weight determination. The larvae were euthanized by immersion in boiling water and, together with the *frass*, were dried for the determination of nutritional composition. Production variables were analyzed in SAS® Studio using PROC MIXED. Treatment effects were evaluated using linear and quadratic polynomial contrasts, with coefficients adjusted using the PROC IML. A significance level of alpha =0.05 was adopted. A significant interaction was observed for larval mass, bioconversion, and larval nitrogen, with linear responses across all days. A 7-day cycle was sufficient to achieve maximum performance with the CP19% and CP22% diets. No significant interaction was observed for nitrogen loss (%), which showed a quadratic response; consequently, greater nitrogen loss was observed in diets with higher %CP levels. It is concluded that, in a seven-day rearing cycle, diets composed of PHFR are viable as a substrate, and that increasing the dietary crude protein level based on PHFR during the growing phase improves productive indices in substrates containing between 19% and 22% CP, however, the best performance occurs at 19% CP, whereas higher levels promote greater nitrogen loss

Keywords: Animal Nutrition, *Black Soldier Fly*, Nitrogen.

3.1 INTRODUÇÃO

O sistema de produção animal de *Hermetia illucens* está consolidado na América, Europa, Ásia, África e Oceania (Chapagaee et al., 2025; Francis; Schmitt; Smetana, 2025; Hervé et al., 2025). O modelo de negócio utiliza a larva de mosca soldado negro (LMSN), um inseto decompositor que se alimenta de matéria orgânica. Quando adequadamente manejados, os resíduos orgânicos apresentam a vantagem de redução de custos na alimentação da LMSN. São inúmeras as possibilidades de resíduos orgânicos (Bekker et al., 2021; Hosseindoust et al., 2023; Spranghers et al., 2017). A coleta seletiva de alimentos por empresas especializadas, viabiliza a utilização do resíduo classificado como pré consumo humano (RPCH) (BRASIL, 2023). Aproveitando-se de material que seria destinado a compostagem, ou descarte em aterros sanitários, como um alimento em potencial para a produção de proteína de alto valor biológico (Pliantiangtam; Chundang; Kovitvadhi, 2021).

As biofábricas de produção de LMSN apresentam modelos de criação utilizando como substrato alimentar diversas fontes nutricionais. Desde sistemas que fazem uso de matérias primas tradicionais (Spranghers et al., 2017) que, neste caso, reduz-se o apelo ecológico e encarece a produção (Fitriana; Laconi; Jayanegara, 2021). Há sistemas que estudam a viabilidade de aplicação de resíduos orgânicos na alimentação (Spranghers et al., 2017), pois apresentam apelo ecológico significativo e contribuem para o manejo de resíduos sólidos de centros urbanos. Muito embora, existam regulamentações para o uso de resíduos orgânicos (Brasil, 2023) destinados a alimentação da LMSN, há dificuldade na padronização desta fonte como alimento para as larvas (Pradabphetrat; Sathawong; Pimsen, 2024).

A padronização envolve tanto a composição nutricional, quanto os parâmetros físico-químicos das dietas tais como: textura, umidade, altura do substrato, pH e etc, que impactam diretamente no desempenho produtivo (Bosch et al., 2020). Estudos demonstram que substratos com umidades de 70 a 80% são passiveis de utilização (Bekker et al., 2021; Cheng; Chiu; Lo, 2017).

Industrialmente, adota-se dois tipos de manejos alimentares (Bosch et al., 2020b; Nakamura et al., 2016). O ciclo único consiste na criação com apenas uma alimentação, com vantagens operacionais de redução do manejo de separação e montagem de caixas de criação. Entretanto, apresenta menor uniformidade de indivíduos e controle de criação. Enquanto a criação em ciclo duplo divide o período que as larvas apresentam consumo ativo de alimento em fase de “Cria” e “Recria”. Estabelecendo manejos alimentares e operacionais específicos para cada fase que garantem ao final do ciclo, larvas de padrão uniforme para o abate (Bosch et al., 2020). Neste caso, dietas especificas para cada fase podem garantir o melhor desenvolvimento e redução do tempo de criação (Schneider et al., 2025). Observa-se o aumento da frequência de alimentações, consequentemente, eleva-se o manejo operacional e custos de produção. Bem como a necessidade de avaliar os indicadores de produção por fase do ciclo.

Por meio de dietas isoenergéticas contendo entre 14 e 19% de PB (Oddon *et al.,* 2022) e, em estudos mais recentes (Schneider *et al.,* 2025a e 2025b), demonstraram que teores entre 15-19% de proteína proporcionaram melhorias nos índices produtivos, independente da fase de criação. Contudo, existem limitações experimentais de manejo com L_1 e, muitas vezes, o início dos ensaios experimentais ocorrem somente a partir dos 6 dias pós eclosão (Schneider *et al.,* 2025a e 2025b; Oddon *et al.,* 2022), gerando lacunas de informações de exigência. Bem como, os ensaios utilizam dieta controle Gainsville que é limitante nutricionalmente, por apresentar

elevado teor em fibras não digestíveis (Schneider *et al.,* 2025a e 2025b). A separação das exigências por categorias animais é conhecimento consolidado (Rostagno *et al*., 2024), principalmente, na avicultura comercial com animais de ciclo curto de desenvolvimento. Ignorar a fase inicial de desenvolvimento larval pode subestimar as exigências, afetando todo o ciclo produtivo, visto que não haverá aproveitamento de todo o potencial produtivo do animal (Seyedalmoosavi et al., 2022).

Trabalhos anteriores, com dietas compostas por farelos e frutas e dieta controle gainesville (Schneider *et al.,* 2025a e 2025b), não avaliaram larvas L_1 nas dietas experimentais, e sim as criaram a partir de 6 dias de idade, devido às dificuldades experimentais em trabalhar com L_1. Desta forma, não separam a exigência das larvas com menos de 6 dias de idade, que baseado no conhecimento dos sistemas tradicionais de produção, pode-se ocorrer maior exigência nutricional nesta fase. De modo que possa subestimar a exigência nutricional da "Cria". Além disso, a utilização de dietas com teores elevados de PB% na "engorda" promovem perdas nitrogenadas e sobrecarga metabólica larval (O'Donnell; Donini, 2017; Schneider et al., 2025; Zhao et al., 2025; Lee et al., 2026), com impactos significativos nos conceitos de sustentabilidade quando dietas compostas por alimentos tradicionais são utilizadas. São poucos estudos que estudam a viabilidade de dietas compostas por RPCH (Oddon; Biasato; Gasco, 2022; Chapagaee et al., 2025; Lee et al., 2026) baseando-se em protocolos de coleta seletiva.

Portanto, objetiva-se determinar a exigência em proteína de larva de *Hermetia illucens* na fase de cria por meio de dietas a base de RPCH contendo diferentes teores de proteína dietética.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Local

A pesquisa foi realizada no laboratório de nutrição animal do departamento de nutrição animal e pastagens do Instituto de Zootecnia da UFRRJ. O projeto foi comunicado a CEUA/IZ/ UFRRJ, nº 0234-02-2025.

Colônia utilizada de LMSN

Utilizaram-se ovos de larvas da espécie *Hermetia illucens* (Insecta: Diptera, Stratomyidae) produzidas pela empresa Let's Fly, CNPJ – 2.041.946/0001-46, sediada em Cachoeiras de Macacu, RJ. Com colônia original adquirida da empresa *Cyns* (Piracicaba, SP, Brasil).

Delineamento Experimental

Utilizou-se delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema de medidas repetidas: 5x4 (n=6), totalizando 120 unidades experimentais. Os tratamentos foram o teor de proteína bruta dietética (%PB): PB22%, PB19%, PB15%, PB13% e PB6%. O período foi representado pelos dias de ciclo de crescimento na fase de cria, com abates nos dias: D7, D8, D9 e D10. Cada repetição foi representada por uma caixa de criação.

Formulação das dietas

As dietas foram compostas por: resíduo orgânico pré-consumo humano (RPCH), amido de milho e fibra de coco (Tabela 1). A empresa Videverde Compostagem, sediada em Cachoeiras de Macacu, RJ, realizou a coleta seletiva do RPCH provenientes de cozinhas industriais e supermercados. O material foi transportado em bombonas de 50L e passou por processo de classificação dos fornecedores para identificação de plásticos e material impróprio. Fornecedores de RPCH que descartavam material orgânico impróprio para a alimentação de insetos (Brasil, 2023), foram descartados. Os resíduos aptos foram encaminhados para o processo de triagem final. As bombonas foram abertas e o material espalhado em instalação apropriada para a identificação/separação de possíveis fontes de plásticos. Em seguida, as frutas, legumes, vegetais e outros tipos de RPCH foram moídos para criar um "blend" e armazenados para posterior utilização como substrato nutricional para as LMSN. O material foi imediatamente encaminhado para a UFRRJ para início do experimento.

Tabela 1. Composição dos ingredientes utilizados na formulação das dietas expressos na matéria seca

Nutrientes (%)	Fibra de coco	Amido de milho	RPCH[1]
Matéria Seca total	89,6	88,1	15,7
Matéria Mineral	10,3	<0,01	6,0
Proteína Bruta	2,4	0,7	22
Extrato Etéreo	0,1	0,4	14,5
Fibra bruta	22,1	0,3	10,4
Fibra em Detergente Neutro	58,4	0,3	20,5
Fibra em Detergente Ácido	55,1	<0,01	18,3
Hemicelulose	3,3	0,3	2,2
ENN[2]	65,1	98,6	47,4
CNF[3]	28,7	98,6	37,4
Energia Bruta (Kcal/Kg de MS)	3695	4216	5293

RPCH[1]: resíduo orgânico pré-consumo humano; Extrativo Não Nitrogenado (ENN%)[2] = 100 – (PB+FB+EE+MM); Carboidratos Não Fibrosos (CNF%)[3] = 100 – (MM+PB+EE+FDN)

O RPCH úmido foi analisado imediatamente para a formulação das dietas na base de MS. O RPCH úmido puro foi considerado como um substrato nutritivo compondo a dieta 22%PB. Nas demais formulações, foram incluídos os ingredientes para causar o efeito diluidor sobre o conteúdo em proteína bruta. As dietas foram formuladas a fim de reduzir os teores proteicos dietéticos, através da inclusão da fibra de coco e do amido. A composição bromatológica das dietas experimentais, está demonstrada na Tabela 2.

Tabela 2. Composição bromatológica analisada das dietas experimentais expressa na matéria seca

Nutrientes (%)	Teor de proteína bruta dietético (%)				
	22%	19%	15%	13%	6%
Matéria Seca total	15,7	16,1	16,1	16,9	18,1
Matéria Mineral	6,0	6,6	7,1	7,5	7,8
Proteína Bruta	22	19,0	15,4	13,4	6,0
Extrato Etéreo	14,5	12,8	9,4	7,4	2,6
Fibra em Detergente Neutro	20,5	22,0	25,0	28,2	34,7
Fibra em Detergente Ácido	18,3	19,8	24,1	28,0	31,6
Hemicelulose	2,22	2,22	0,92	0,17	3,12
CNF[1]	37,4	39,6	43,1	43,5	48,9
Energia Bruta (Kcal/Kg)	5293	5159	4950	4741	4323
NIDN[2]	0,35	0,30	0,30	0,30	0,31
PIDN[3]	2,2	1,9	1,9	1,8	2,0
Relação Energia:Proteína[4]	241	271	321	354	720
Relação CNF:Proteína[5]	1,7	2,1	2,8	3,2	8,0

Carboidratos Não Fibrosos (CNF)[1] = 100 – (MM+PB+EE+FDN); Nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN)[2], Proteína insolúvel em detergente neutro (PIDN)[3] (Mertens, 1997). Relação energia:proteína[4] (Kcal/Kg) = (Energia Bruta / Proteína bruta); Relação energia:proteína[5] (%) = (CNF / Proteína bruta)

Realizou-se a homogeneização dos ingredientes de cada dieta experimental de forma manual (Tabela 3). Para o ajuste adequado de umidade entre as dietas, realizou-se o balanço de massas (Equação 1) a fim de ajustar a umidade final para 83% de umidade.

Equação (1)

$$Maad = \frac{Mgo * \omega ao - \omega af}{1 - \omega af}$$

M_{aad} = Massa de água adicionada ao substrato para atingir a umidade desejada

M_{go} = Massa do alimento úmido inicial (Kg)

ω_{ao} = Fração mássica inicial de água, representando a umidade presente no alimento úmido, dividida por 100

ω_{af} = Fração mássica final de água, representando a umidade que se deseja atingir no alimento úmido, dividida por 100

Tabela 3. Inclusão de ingredientes (%) na matéria seca e natural em cada dieta

Ingrediente (%)	Dietas									
	PB22%		PB19%		PB16%		PB13%		PB6%	
	MN	MS	MN	MS	MN	MS	MN	MS	MN	MS
RPCH	100	100	90	90	74,4	74,4	58,8	58,8	27,5	27,5
Fibra de coco	0	0	1,19	5	3,04	12,8	4,9	20,6	8,62	36,25
Amido de milho	0	0	1,17	5	2,99	12,8	4,81	20,6	8,46	36,25
Água	0	0	7,64	0	19,57	0	31,49	0	55,42	0
Total (%)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

MS: Matéria seca; MN: Matéria Natural

Ensaio de criação das LMSN

Foram utilizadas caixas plásticas (19,6 x 15,1 x 8,8cm) com 297 cm² e 2605 cm³. Em cada caixa foram adicionados 0,2g de ovos e 717g de dieta úmida/tratamento. Utilizaram-se ovos com até 24 horas de postura, para que não houvesse diferença de tempo de eclosão. A contagem do tempo de idade das larvas iniciou-se no dia de montagem do experimento como instante 0. Um suporte plástico recebeu os ovos e foi posto sobre o substrato. As caixas foram identificadas e acondicionadas aleatoriamente em sala protegida de invasores, com temperatura média de 28ºC e umidade média de 69%.

Utilizou-se ventilação direta sobre as caixas a partir do 4º dia, com o objetivo de controle de umidade. Nos dias de abate, as caixas correspondentes ao dia foram pesadas e, em seguida, procedeu-se a separação mecânica através de peneiras e da coleta manual das larvas. Após, as massas úmidas de larvas e *frass* foram pesadas e amostradas para a posterior análises bromatológicas. Separaram-se amostra de larvas para registro de imagem.

Peso médio larval e total de larvas e densidades

Determinou-se o peso médio larval através da amostragem de 5g de larva de cada unidade experimental e, em seguida, registrou-se a imagem, para posterior contagem pelo *software* Click Master (Bogdan *et al*., 2022) através da seguinte equação:

Equação (2)

$$Peso\ médio\ larval\ (mg) = \frac{Massa\ amostral\ larval_{(mg)}}{Número\ de\ larvas\ na\ amostra}$$

Após o cálculo do peso médio larval, foi possível determinar o total de larvas através da seguinte equação:

Equação (3)

$$Total\ de\ larvas = \frac{Massa_{larval\ totalMN\ (mg)}}{Peso\ médio\ larval\ _{(mg)}}$$

A partir do total de larvas foi possível determinar a densidade larval por área (Equação 4) e a densidade larval por volume (Equação 5), sendo o volume baseado na altura do substrato.

Equação (4)

$$\text{D}ensidade\ larval\ m^2 = \frac{Total\ de\ larvas}{Área\ da\ caixa}$$

Equação (5)

$$\text{D}ensidade\ larval\ m^3 = \frac{Total\ de\ larvas}{Volume\ ocupado\ pelo\ substrato}$$

Bioconversão

Utilizou-se a massa de larva e a massa do substrato inicial na matéria seca para o cálculo de bioconversão (BC%) segundo Bohm *et al.* (2022):

Equação (6)

$$\text{BC}(\%) = \left(\frac{\text{Massa larval}_{\text{MS}}}{\text{Massa inicial substrato}_{\text{MS}}}\right) \times 100$$

A bioconversão de *frass* (Yakti *et al.;* 2022) foi calculada a partir da massa de *frass* e de substrato inicial, corrigidas para a matéria seca:

Equação (7)

$$\text{BC}(\%) = \left(\frac{\text{Massa } frass_{\text{MS}}}{\text{Massa inicial substrato}_{\text{MS}}}\right) \times 100$$

Balanço de Nitrogênio

Realizou-se o cálculo da quantidade de nitrogênio (%N) contido nas dietas, nas larvas e no *frass* através da fórmula de determinação de nitrogênio total (Kjeldahl) (AOAC, 1995), sem a utilização do fator de correção. O teor de nitrogênio proveniente dos ovos não foi considerado, entretanto, o erro foi homogêneo para todas as unidades experimentais. Com o valor de N% realizou-se a determinação de N (g) presente na dieta, larva e *frass*, através da seguinte equação:

Equação (8)

$$\text{Nitrogênio larval}_{\text{(g)MS}} = \frac{\%\text{Nlarval}_{\text{MS}} \times \text{massa larval produzida}_{\text{(g)MS}}}{100}$$

Onde: Nitrogênio larval$_{\text{(g) MS}}$ = gramas de nitrogênio larval produzido na MS; %N larval$_{\text{MS}}$ = % de N larval na matéria seca.

Equação (9)

$$\text{Nitrogênio } frass_{\text{(g)MS}} = \frac{\%\text{N}frass_{\text{MS}} \times \text{massa } frass \text{ produzida}_{\text{(g)MS}}}{100}$$

Onde: Nitrogênio *frass*$_{\text{(g) MS}}$ = Gramas de nitrogênio *frass* produzido na MS; %N *frass*$_{\text{MS}}$ = % de N *frass* na matéria seca.

A partir da quantificação da massa de nitrogênio produzida pela larva e *frass*, calculou-se a retenção de nitrogênio (%) da larva, *frass* e a perda de N, através das seguintes equações:

Equação (10)

$$\%\text{Retenção do N}_{\text{Larva ou } frass} = \frac{\text{Massa de N}_{\text{Larva ou } frass}}{\text{Massa de N}_{\text{Substrato}}} \times 100$$

Equação (11)

$$\%\text{N}_{\text{Perdido}} = 100 - \left(\%\text{Retenção do N}_{\text{Larva}} + \%\text{Retenção do N}_{frass}\right)$$

Onde: $\%N_{perdido}$ = Teor de nitrogênio (%) perdido durante a produção.

Procedimento de abate

As larvas foram transferidas para sacos de *voil* e abatidas em água fervente por 90 segundos (Leni; Caligiani; Sforza, 2019). Em seguida, foram postas para drenagem. Após, foram imediatamente colocadas para secagem em estufa de ventilação forçada a 55ºC.

Análises Bromatológicas

Os ingredientes e dietas foram avaliados quanto à matéria seca total (MStotal), proteína bruta (PB), cinzas (MM), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), em que o FDN foi utilizado alfa amilase e não foi corrigido para cinzas (Detmann et al., 2025), e energia bruta (EB) (Silva e Queiroz, 2006) e calculou-se os Carboidratos não fibrosos (CNF) (Sniffen et al., 1992). As dietas também foram analisadas quanto a nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN) e proteína insolúvel em detergente neutro (PIDN) (Mertens, 1997). As amostras de larvas e *frass* foram analisadas quanto à MStotal, PB e EE (Detmann et al., 2025).

Análise Estatística

Os dados foram analisados utilizando-se o PROC MIXED do software SAS® Studio, segundo delineamento inteiramente casualizado em esquema de medidas repetidas:

$$Y_{ijk} = m_i + PB_i + D_k + PB*D_{ij} + E_{ijk},$$

Onde, m_i: Média geral; PB_i: Efeito do tratamento; D_k: Efeito do período; $PB*D_{ij}$: Interação PB*D; E_{ijk}: Erro aleatório. A estrutura de covariância adotada foi VC (*variance components*), em função da independência entre as unidades experimentais (caixas). Os efeitos de tratamento foram avaliados em contrastes polinomiais de ordem linear e quadrática, com coeficientes ajustados através da função "orpol" do PROC IML. Adotou-se alfa igual a 0.05.

3.3 RESULTADOS

As produções de massa larval, *frass* e de bioconversão apresentaram efeito de interação entre teores de PB e dia de crescimento significativos ($p<0,05$). Os dados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Produção de massa larval, *frass* e de bioconversão de larvas de *Hermetia illucens* na matéria seca, submetidas a dietas com teores crescentes de proteína e abatidas em diferentes dias de crescimento.

Variável	Teor de proteína dietética (%)						Dias					p-valor			
	6	13	16	19	21	SE	7	8	9	10	SE	PB*D	D	PB-L	PB-Q
Massa larval (g)	8,49	17,78	21,24	25,50	27,69	0,36	21,40	19,58	19,53	20,03	0,32	<,005	<,005	<,005	0,0445
Massa *frass* (g)	97,38	68,47	59,80	55,46	49,91	0,65	68,52	67,28	65,46	62,75	0,58	<,005	<,005	<,005	<,005
Bioconversão larval (%)	6,53	14,64	18,31	22,04	24,46	0,31	18,30	16,71	16,65	17,11	0,27	<,005	<,005	<,005	0,3276
Bioconversão *frass* (%)	74,85	56,37	51,56	47,94	43,21	0,54	46,86	55,82	54,43	52,03	0,488	<,005	<,005	<,005	<,005

Como houve interação significativa, optou-se por realizar o desdobramento das interações e a descrição por regressão (Figura 1).

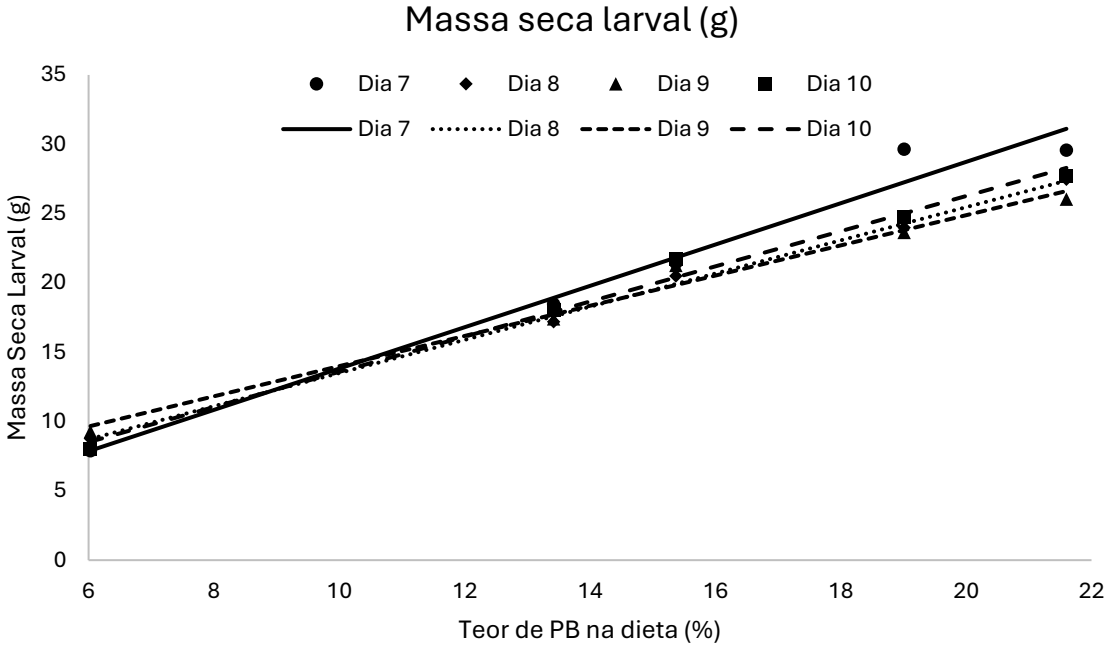


Figura 1. Regressões da massa seca larval (g) de larvas alimentadas com dietas compostas por teores crescentes de proteína e abatidas em diferentes dias de crescimento

Tabela 5. Parâmetros das equações de regressão da massa larval MS (g)

Dia	c	b	p-valor - L	R^2 - L	p-valor – Q	R^2 - Q
7	-1,0846	1,4906	<,0001	0,9740	0,4530	-
8	1,5382	1,1962	<,0001	0,9972	0,9909	-
9	3,1128	1,0885	<,0001	0,9845	0,1453	-
10	0,9045	1,2681	<,0001	0,9888	0,0657	-

b = Inclinação; c = Intercepto R^2 – L = Coeficiente de determinação linear e R^2 – Q = Coeficiente de determinação quadrático

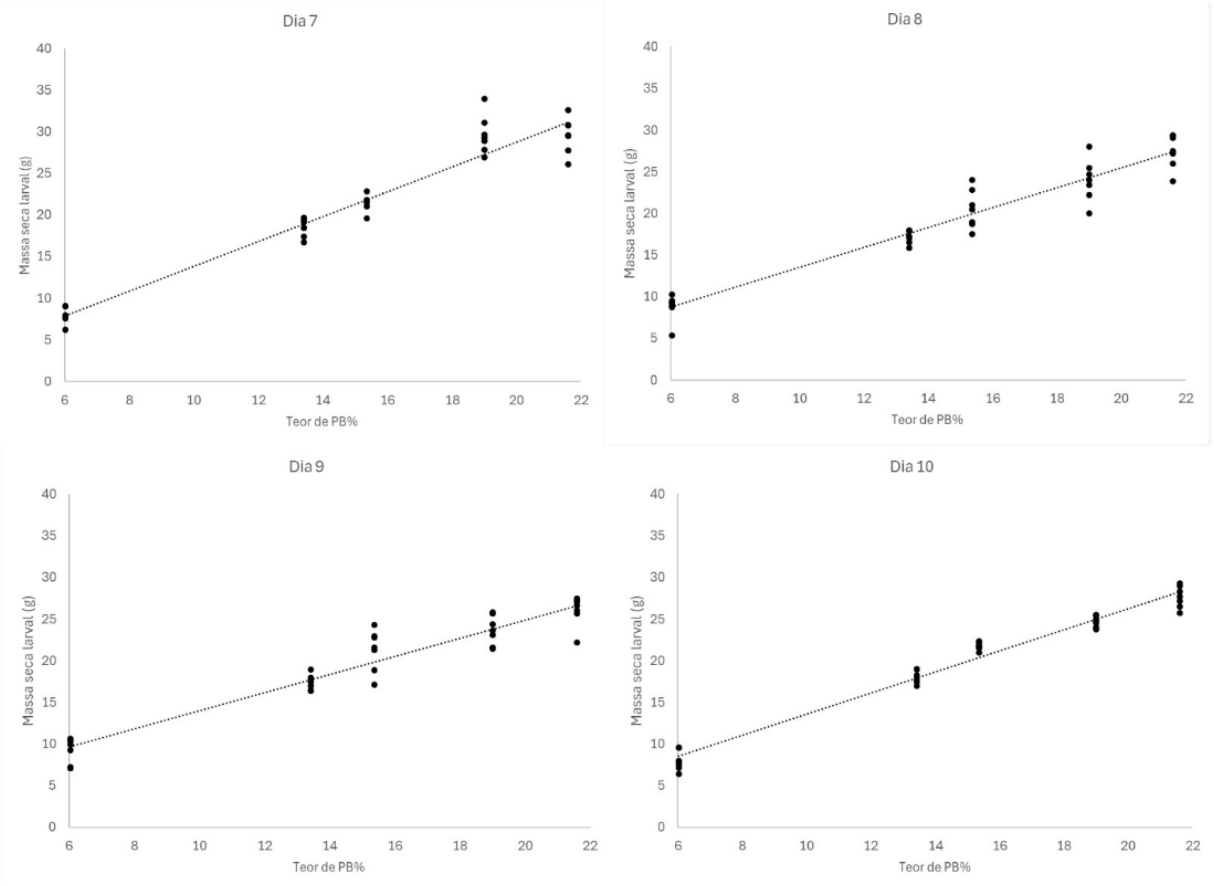


Figura 2. Regressões da massa seca larval (g), separadas por dia, de larvas alimentadas com dietas compostas por teores crescentes de proteína e abatidas em diferentes dias de crescimento

Houve interação significativa entre teor de PB e dia ($p<0,05$), com efeito linear significativo ($p<0,05$) da elevação do teor proteico em cada dia de crescimento. O sétimo dia apresentou ganho de massa larval superior em função do aumento do teor de proteína, quando comparado aos demais dias.

O sétimo dia foi o momento em que houve o máximo ganho de massa para os teores de PB dietéticos avaliados. Sendo que os teores de 19 e 22% de PB apresentaram médias estimadas mais próximas de 27,3 e 31,1g, com indicativos de tendência de queda de ganho no sétimo dia.

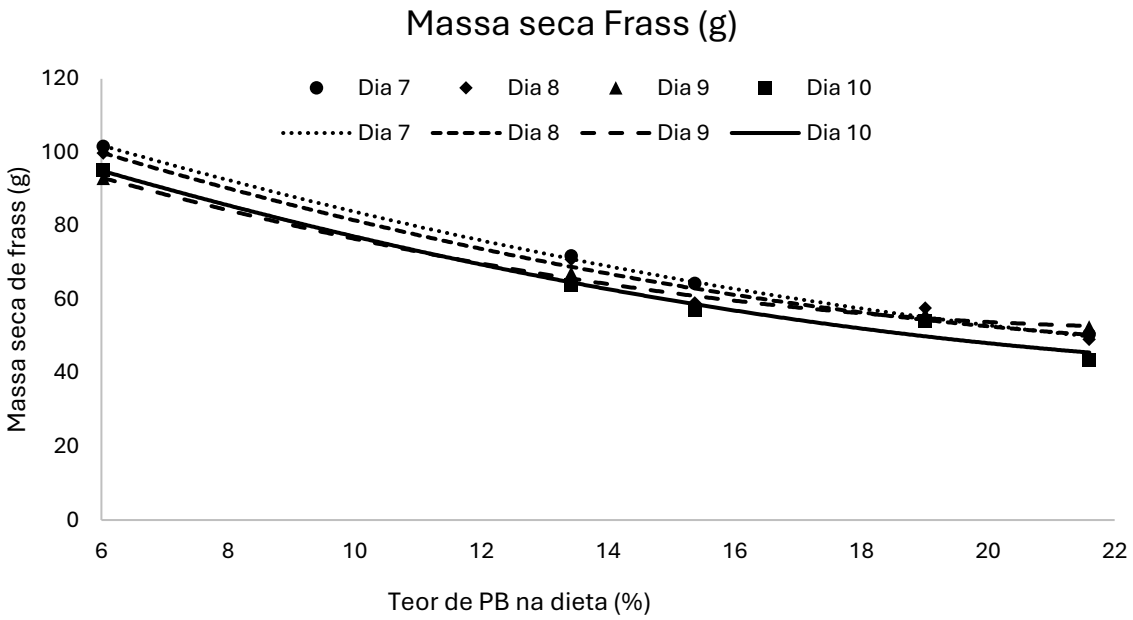


Figura 3. Regressões da massa seca de *frass* (g), de larvas alimentadas com dietas com teores crescentes de proteína bruta e abatidas em diferentes dias.

Tabela 6. Parâmetros da equação de regressão da massa seca de *frass* (g) na MS

Dia	c	b	a	p-valor L	R^2 - L	p-valor Q	R^2 - Q
7	135,21	-6,1632	-0,1026	<,0001	-	<,0001	0,9988
8	135,02	-6,5873	0,1235	<,0001	-	<,0001	0,9799
9	126,33	-6,3488	0,1363	<,0001	-	<,0001	0,9922
10	128,72	-6,2935	0,1131	<,0001	-	<,0001	0,9848

a = Coeficiente Quadrático; b = Inclinação; c = Intercepto; R^2 – L = Coeficiente de determinação linear e R^2 – Q = Coeficiente de determinação quadrático

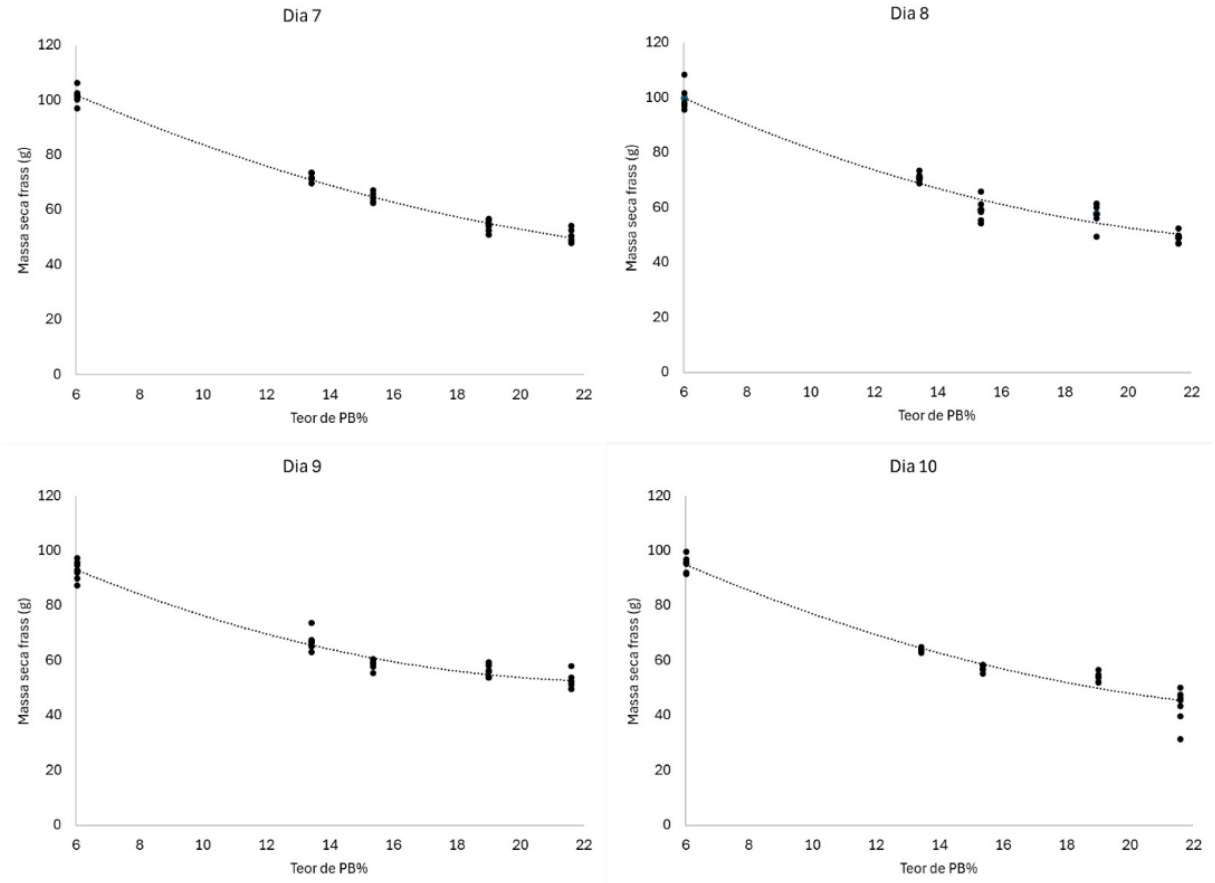


Figura 4. Regressões da massa seca de *frass* (g), separadas por dia, de larvas alimentadas com dietas com teores crescentes de proteína bruta e abatidas em diferentes dias.

Houve interação significativa entre teor de PB e dia ($p<0,05$) sobre a variável analisada. Desdobrando-se os dias, observou-se efeito quadrático significativo ($p<0,05$) de redução de massa seca de *frass* em função do aumento da PB dietética. No décimo dia, observou-se que a dieta contendo superior teor de PB apresentou dispersões dos valores médios de redução do *frass*. As inclusões de 19 até 22% de PB permitiram melhor consumo dos nutrientes que refletiu na redução da massa de *frass*. Observou-se que no sétimo dia, a redução do *frass* já havia atingido 55g para a dieta de 19,01%PB e de 52g na dieta de 22%. No décimo dia, as larvas continuaram a consumir o material úmido restante, mas não proporcionou ganho de peso para as larvas, havendo redução da massa de *frass* para teores de 49,95g e 45,54g para as dietas de 19 e 22% de PB, respectivamente.

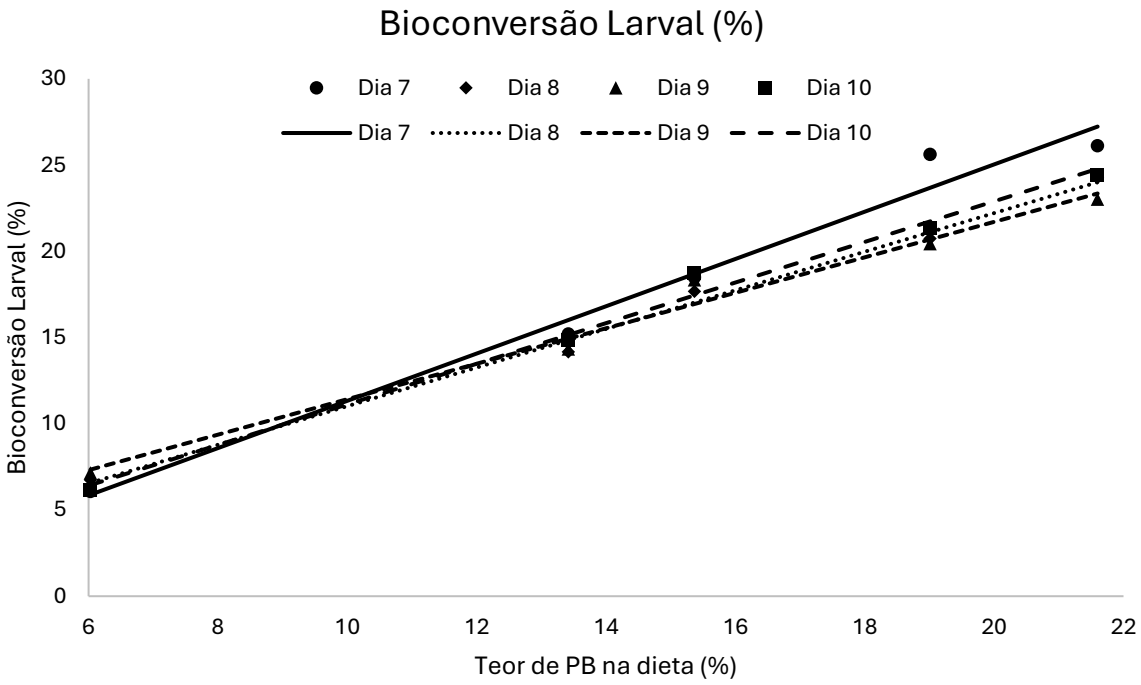


Figura 5. Regressões da bioconversão larval (%), de larvas alimentadas com dietas com teores crescentes de proteína bruta e abatidas em diferentes dias.

Tabela 7. Parâmetros da equação de regressão da bioconversão larval (%)

Dia	c	b	p-valor - L	R^2 - L	p-valor– Q	R^2 - Q
7	-2,3799	1,3709	<,0001	0,9791	0,9022	-
8	-0,1748	1,1195	<,0001	0,9937	0,6207	-
9	1,1407	1,0283	<,0001	0,9836	0,2979	-
10	-0,6527	1,1775	<,0001	0,9895	0,1985	-

b = Inclinação; c = Intercepto R^2 – L = Coeficiente de determinação linear e R^2 – Q = Coeficiente de determinação quadrático

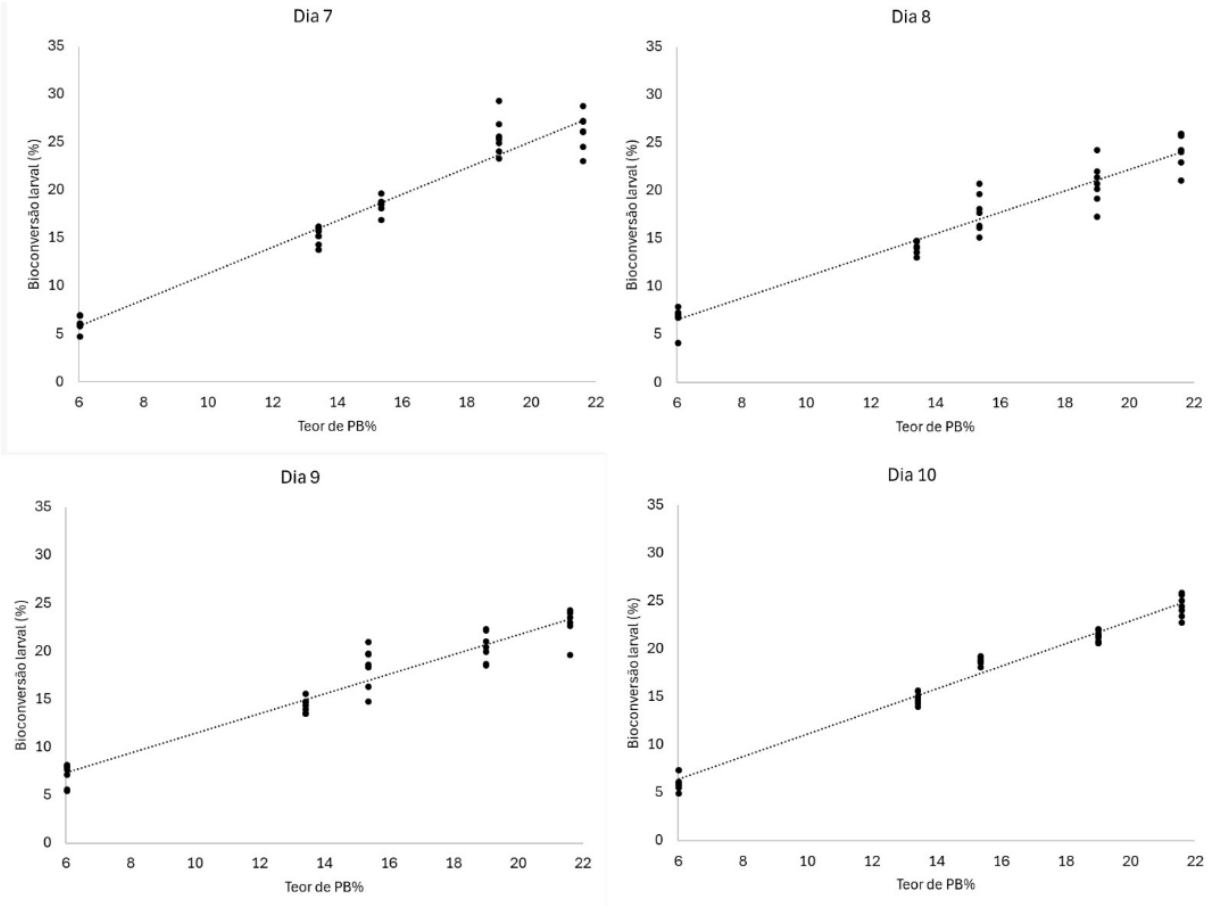


Figura 6. Regressões da bioconversão larval (%), separadas por dia, de larvas alimentadas com dietas com teores crescentes de proteína bruta e abatidas em diferentes dias.

Houve interação significativa entre teor de PB e dia ($p<0,05$). Desdobrando-se os dias, observou-se efeito linear significativo ($p<0,05$) de aumento da BC larval em função do aumento da PB dietética. O sétimo dia apresentou desempenho superior quando comparado aos demais. A máxima bioconversão estimada foi de 27,2% no sétimo dia na dieta contendo 22% de PB. A bioconversão larval reduziu significativamente em função dos dias para todos os teores de PB.

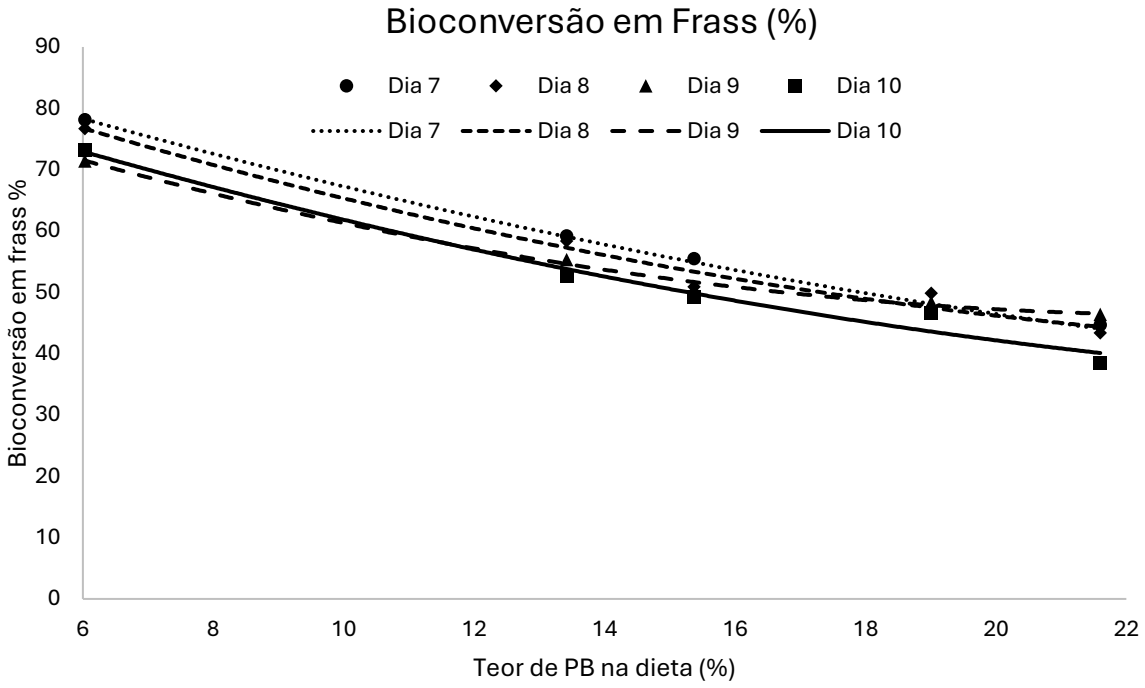


Figura 7. Regressões da bioconversão em *frass* (%), de larvas alimentadas com dietas com teores crescentes de proteína bruta e abatidas em diferentes dias.

Tabela 8. Parâmetros da equação de regressão da bioconversão de *frass*

Dia	c	b	a	p-valor L	R^2 - L	p-valor Q	R^2 - Q
7	97,758	-3,5364	0,0486	<,0001	-	0,0119	0,9970
8	97,934	-3,9348	0,0673	<,0001	-	0,0006	0,9790
9	91,906	-3,8904	0,0828	<,0001	-	<,0001	0,9957
10	93,136	-3,7138	0,0583	<,0001	-	0,0028	0,9795

a = Coeficiente Quadrático; b = Inclinação; c = Intercepto; R^2 – L = Coeficiente de determinação linear e R^2 – Q = Coeficiente de determinação quadrático

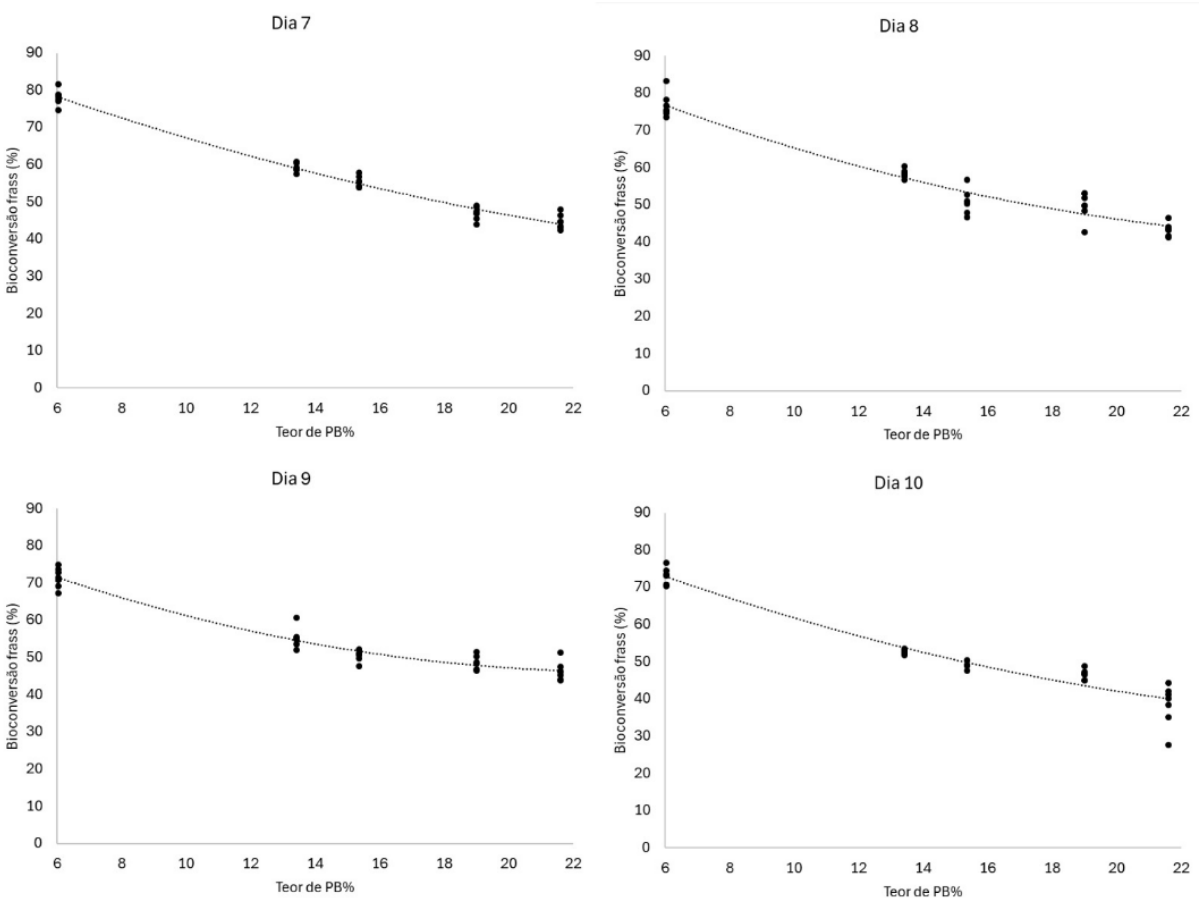


Figura 8. Regressões da bioconversão em *frass* (%), separadas por dia, de larvas alimentadas com dietas com teores crescentes de proteína bruta e abatidas em diferentes dias.

Houve interação significativa entre teor de PB e dia ($p<0,05$). Desdobrando-se os dias, observou-se efeito quadrático significativo ($p<0,05$) de redução da BC de *frass* em função do aumento da PB dietética. O sétimo dia apresentou bioconversão em *frass* superior quando comparado aos demais. As bioconversões estimadas do dia 7 foram de 48% e de 47,93% para os teores de PB de 19,01 e 22% de PB, respectivamente. Valores que descrevem tendência de estabilização da bioconversão nas maiores inclusões de proteína.

Os indicadores de produção do total de larvas, peso médio e densidades estão demonstradas na tabela 9.

Tabela 9. Total de larvas, peso médio e densidades larvais em cm^2 e cm^3 de larvas de *Hermetia illucens* submetidas a dietas com teores crescentes de proteína e abatidas em diferentes dias de crescimento.

Variável	Teor de proteína dietética (%)						Dias					p-valor			
	6	13	16	19	21	SE	7	8	9	10	SE	PB*D	D	PB-L	PB-Q
Total de larvas	4121	4990	4830	5183	4980	114	5303	4919	4616	4446	102	<,005	<,005	<,005	<,005
Peso médio larval (mg)	8,85	15,18	18,23	19,30	22,16	0,42	18,50	15,89	16,34	16,23	0,38	<,005	<,005	<,005	0,1555
Densidade (larva/cm^2)	14,02	16,97	16,43	17,63	19,64	0,39	18,04	16,73	15,70	15,12	0,35	<,005	<,005	<,005	<,005
Densidade (larva/cm^3)	3,55	4,99	4,69	4,70	4,91	0,11	5,02	4,67	4,38	4,21	0,10	<,005	<,005	<,005	<,005

Houve interação significativa entre teor de PB e dia ($p<0,05$) sobre o total de larvas, peso médio e densidades larvais em cm^2 e cm^3. Os dias de crescimento foram desdobrados e os efeitos avaliados por meio de regressão.

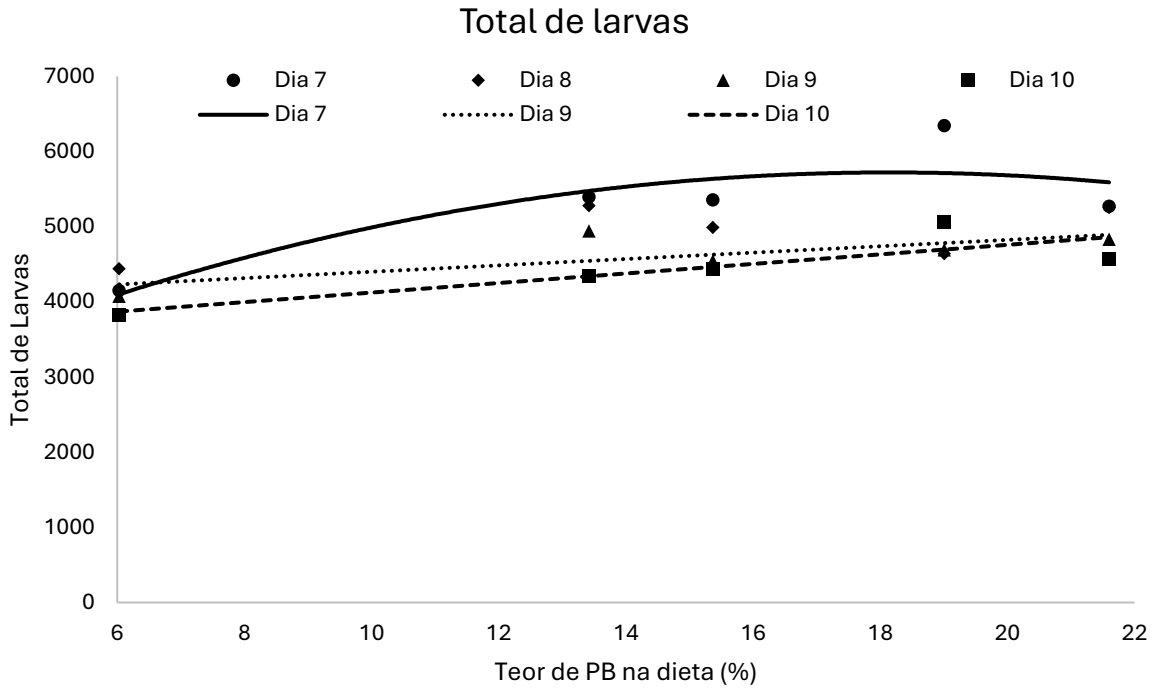


Figura 9. Regressões do total de larvas quando alimentadas com dietas com teores crescentes de proteína bruta e abatidas em diferentes dias.

Tabela 10. Parâmetros da equação de regressão do total de larvas

Dia	c	b	a	p-valor L	R^2 - L	p-valor Q	R^2 - Q
7	2088,6	400,4	-11,032	<.0001	-	0,0029	0,7584
8	-	-	-	0,0672	-	0,2522	-
9	3976,4	42,386	-	0,0223	0,5571	0,2085	-
10	3488,6	63,491	-	0,0008	0,7215	0,3938	-

a = Coeficiente Quadrático; b = Inclinação; c = Intercepto; R^2 – L = Coeficiente de determinação linear e R^2 – Q = Coeficiente de determinação quadrático

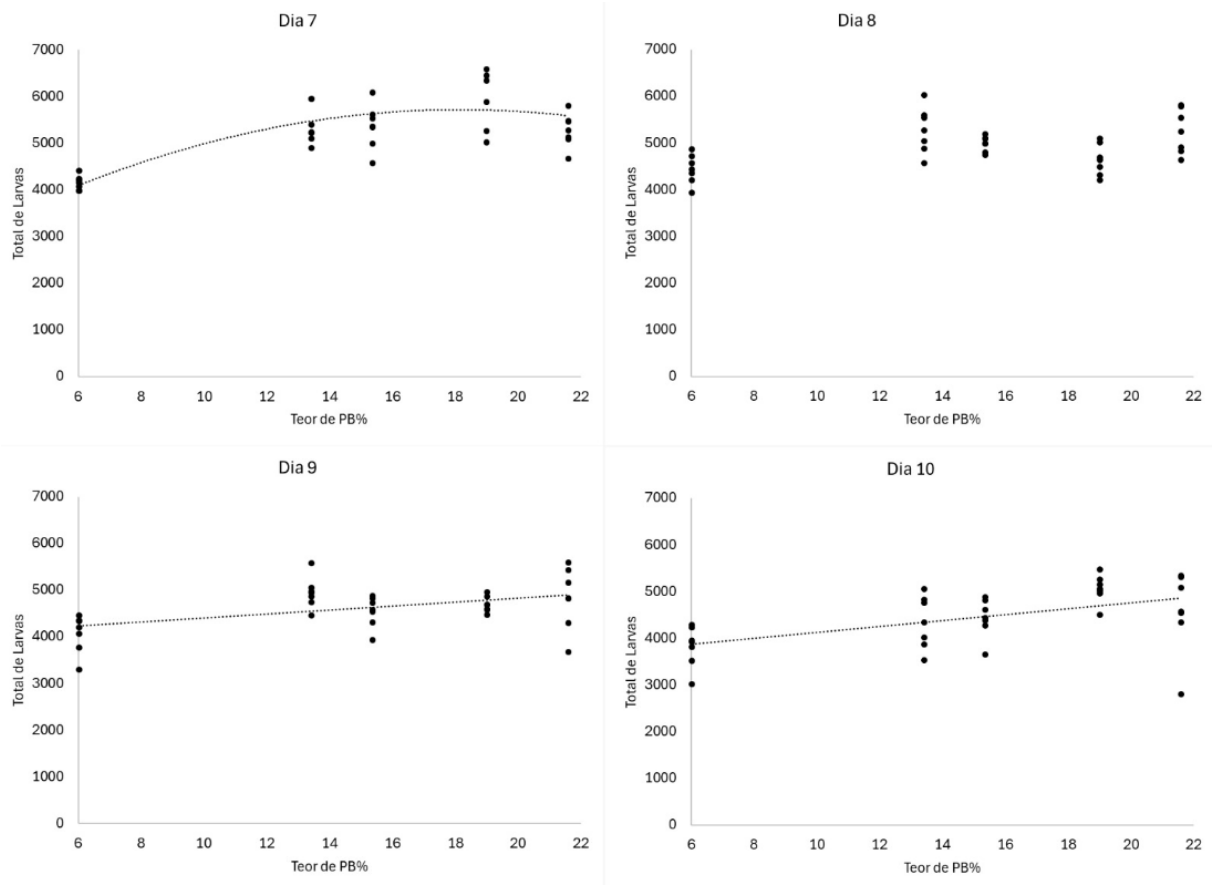


Figura 10. Regressões do total de larvas, por dia, de larvas alimentadas com dietas com teores crescentes de proteína bruta e abatidas em diferentes dias.

Quanto ao total de larvas, observou-se efeito quadrático significativo ($p<0,05$) de aumento do total de larvas em função do aumento da PB dietética no sétimo dia, com ponto de máxima estimado de 5721 larvas. O oitavo dia não se ajustou a nenhum modelo de regressão. Enquanto os dias 9 e 10 apresentaram efeito linear significativo ($p<0,05$). O total de larvas foi sempre menor nas dietas com 6% de PB.

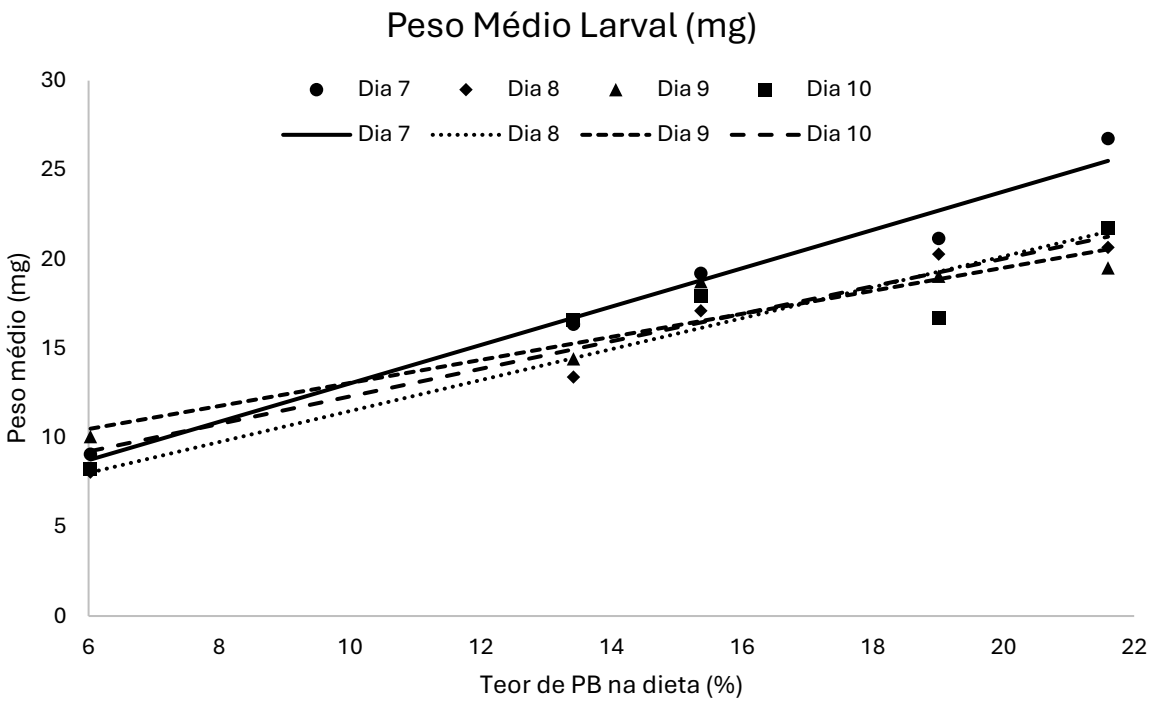


Figura 11. Regressões do peso médio larval (mg), de larvas alimentadas com dietas com teores crescentes de proteína bruta e abatidas em diferentes dias.

Tabela 11. Parâmetros da equação de regressão do peso médio larval (mg)

Dia	c	b	p-valor - L	R^2 - L	p-valor– Q	R^2 - Q
7	2,2852	1,075	<,0001	0,9739	0,3284	-
8	2,8157	0,8669	<,0001	0,9660	0,6438	-
9	6,6037	0,06455	<,0001	0,8964	0,1285	-
10	4,5896	0,7716	<,0001	0,8727	0,0676	-

b = Inclinação; c = Intercepto R^2 – L = Coeficiente de determinação linear e R^2 – Q = Coeficiente de determinação quadrático

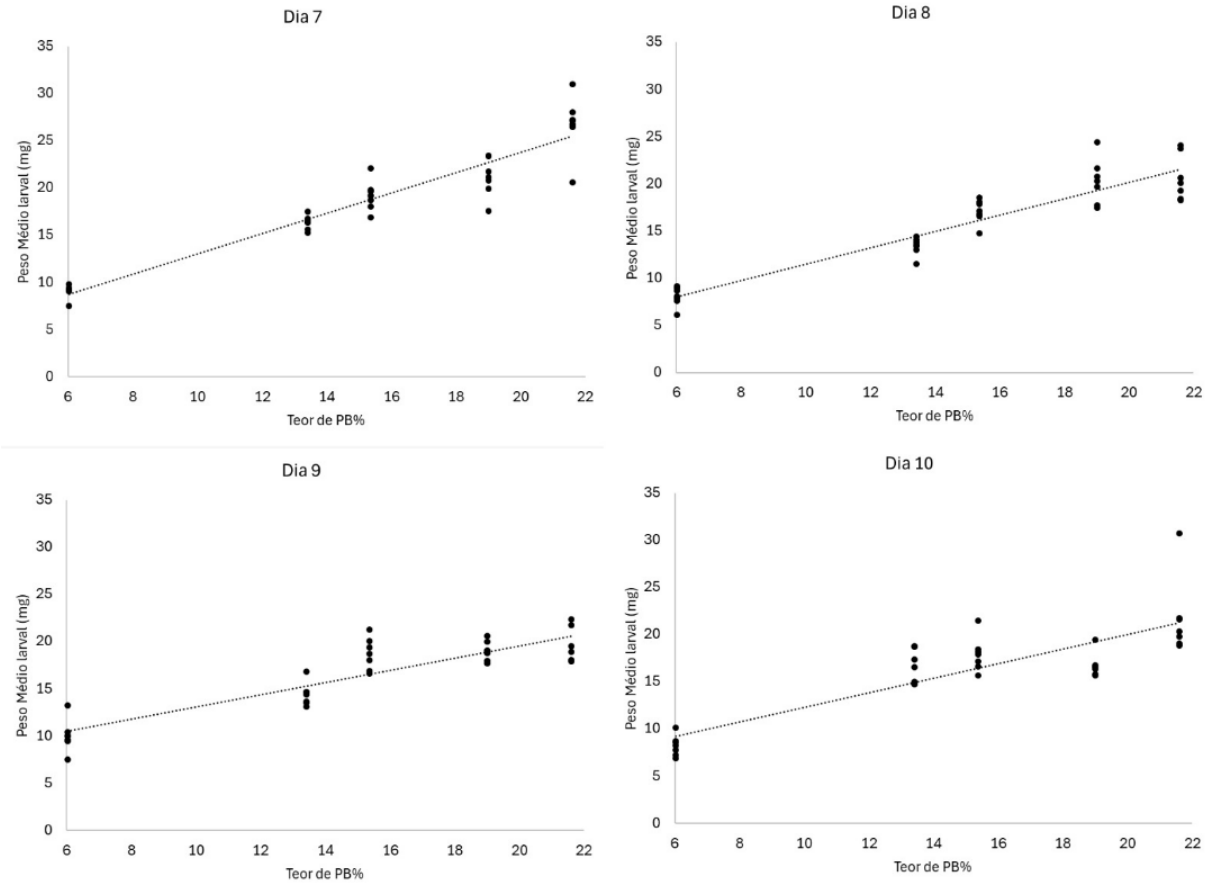


Figura 12. Regressões do peso médio larval (mg), por dia, de larvas alimentadas com dietas com teores crescentes de proteína bruta e abatidas em diferentes dias.

Quanto ao peso médio larval, observou-se efeito linear significativo ($p<0,05$) de ganho crescente de peso em função do incremento da PB dietética em todos os dias, com valores de R^2 acima de 87%. O sétimo dia apresentou superior desempenho com o intervalo de 8,7 a 25,5mg, enquanto no décimo dia houve redução para 5,2 a 21,5mg.

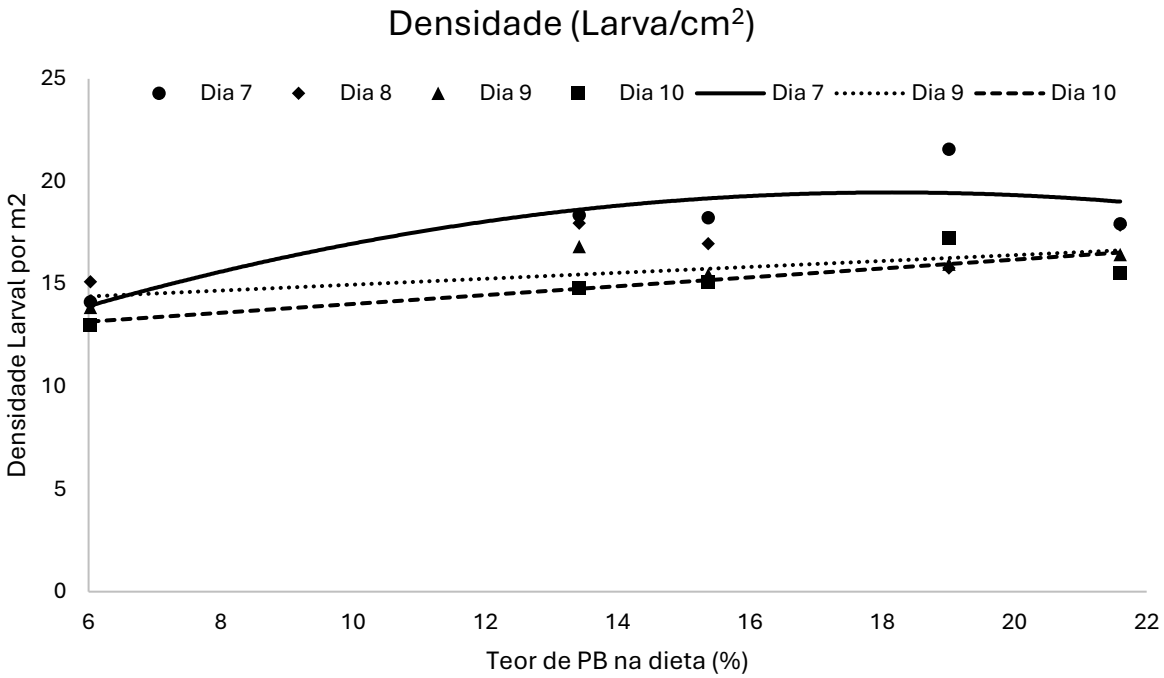


Figura 13. Regressões da densidade (larva/cm^2), de larvas alimentadas com dietas com teores crescentes de proteína bruta e abatidas em diferentes dias.

Tabela 12. Parâmetros da equação de regressão da densidade (larva/cm^2)

Dia	c	b	a	p-valor L	R^2 - L	p-valor Q	R^2 - Q
7	7,1068	1,3616	-0,0375	<.0001	-	0,0029	0,7584
8	-	-	-	0,0674	-	0,2506	-
9	13,526	0,1441	-	0,0224	0,5575	0,2101	-
10	11,867	0,216	-	0,0008	0,7214	0,3950	-

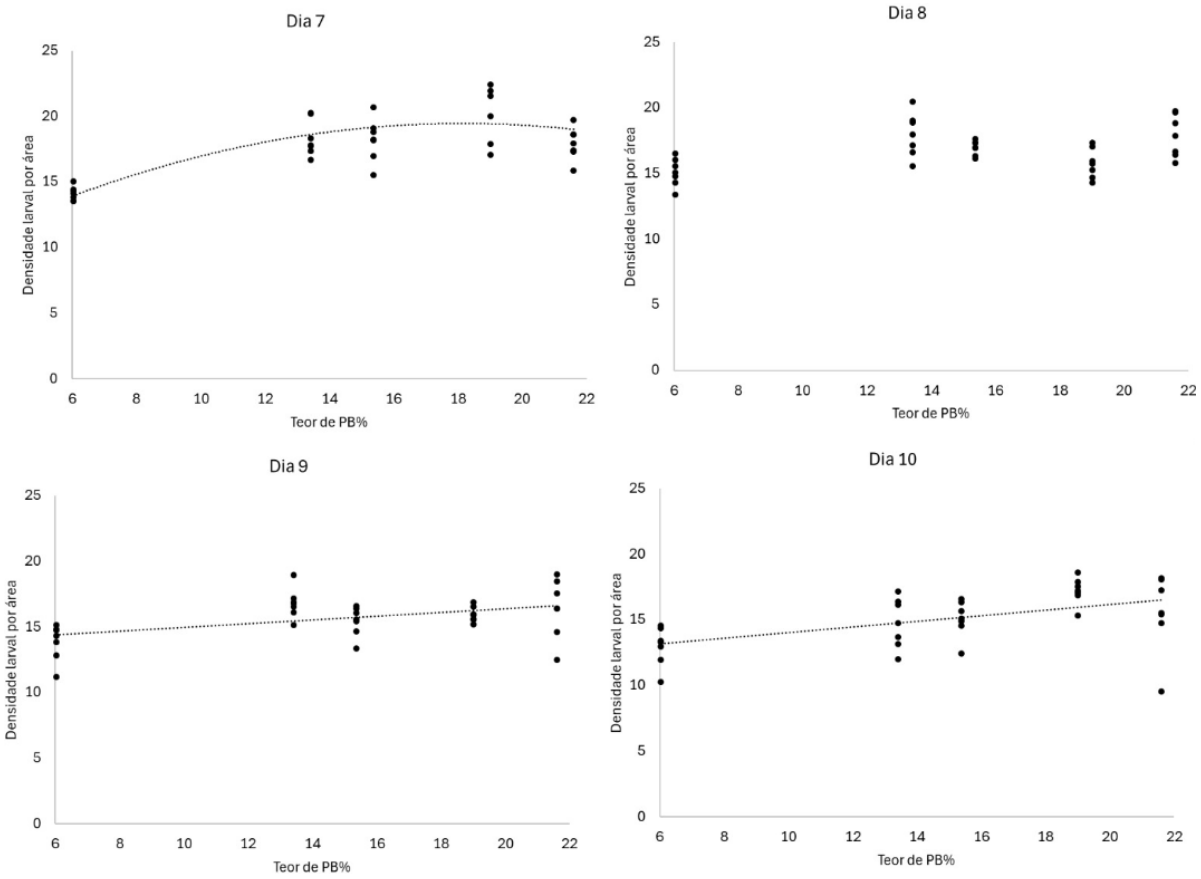


Figura 14. Regressões da densidade (larva/cm^2), por dia, de larvas alimentadas com dietas com teores crescentes de proteína bruta e abatidas em diferentes dias.

Quanto a densidade (larva/cm^2), observou-se efeito quadrático significativo ($p<0,05$) em função do incremento da PB dietética no dia 7, com ponto de máxima de 18,2 larvas/cm^2. Não houve ajuste de regressão no oitavo dia, enquanto observou-se efeito linear crescente significativo nos dias 9 e 10, com valores de 16,4 e 15,5 larvas/cm^2, respectivamente, porém com valores de R^2 de baixo a médio poder de predição de 0,56 a 0,72. A densidade foi superior no sétimo dia quando comparado aos demais dias de crescimento.

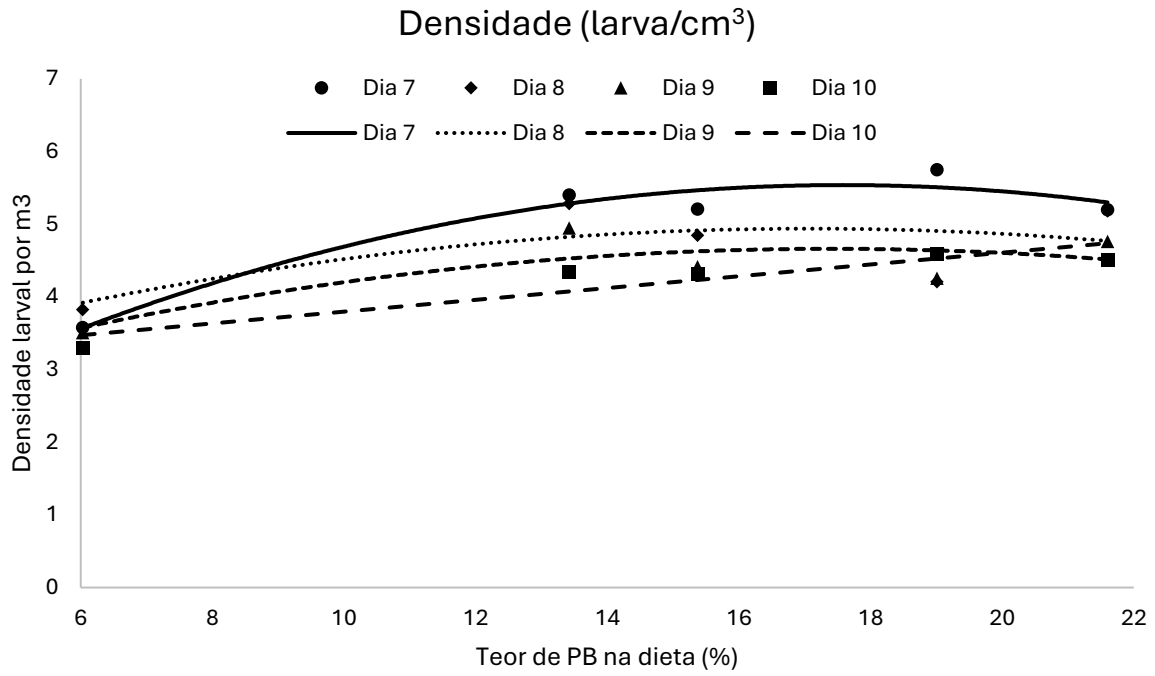


Figura 15. Regressões da densidade (larva/cm^3), de larvas alimentadas com dietas com teores crescentes de proteína bruta e abatidas em diferentes dias.

Tabela 13. Parâmetros da equação de regressão da densidade (larva/cm^3)

Dia	c	b	a	p-valor L	R^2 - L	p-valor Q	R^2 - Q
7	0,9821	0,5184	-0,0147	<.0001	-	<,0001	0,9472
8	2,505	0,2847	-0,0083	<.0001	-	0,0198	0,4470
9	2,1246	0,2914	-0,0084	<.0001	-	0,0192	0,6518
10	2,9849	0,0811	-	<.0001	0,8447	0,0627	-

a = Coeficiente Quadrático; b = Inclinação; c = Intercepto; R^2 – L = Coeficiente de determinação linear e R^2 – Q = Coeficiente de determinação quadrático

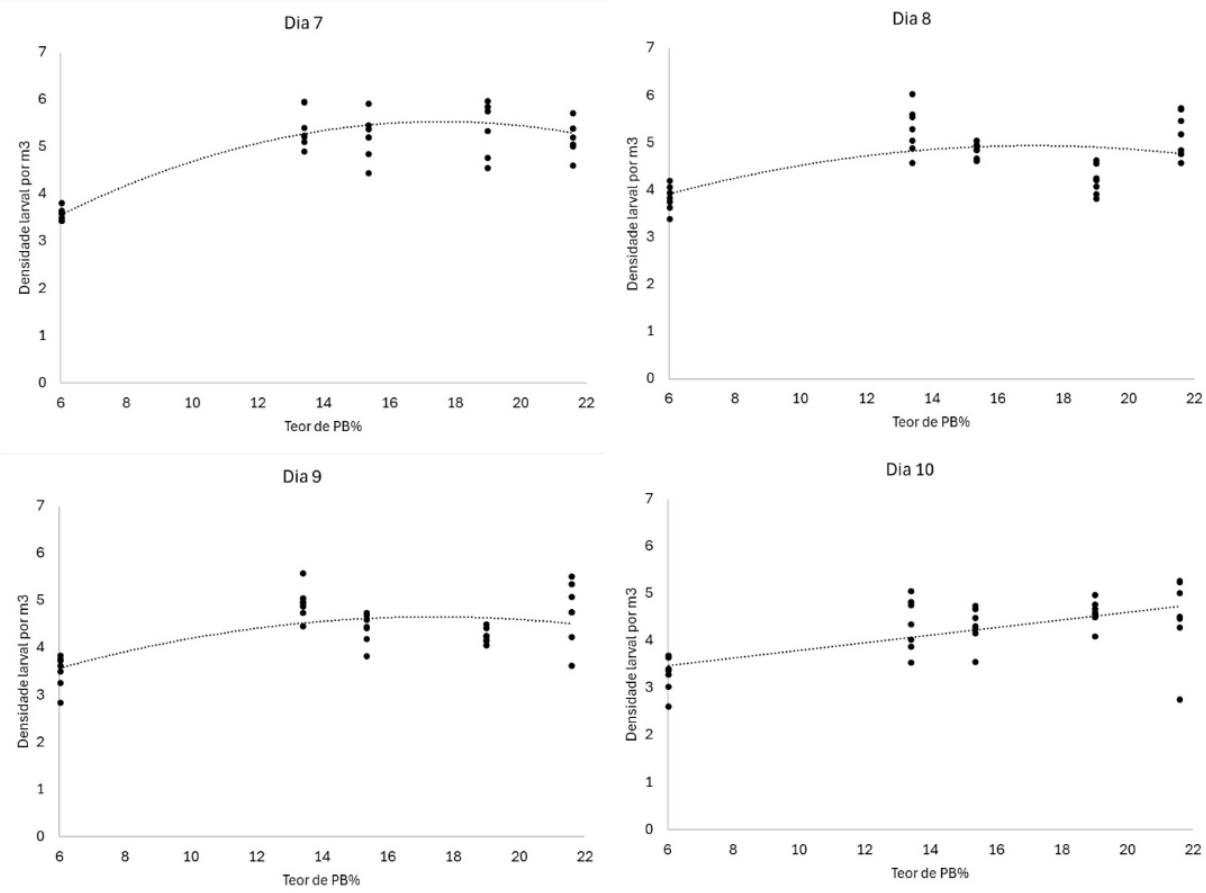


Figura 16. Regressões da densidade (larva/cm^3), por dia, de larvas alimentadas com dietas com teores crescentes de proteína bruta e abatidas em diferentes dias.

Quanto a densidade (larva/cm^3), observou-se efeito quadrático significativo ($p<0,05$) em função do incremento da PB dietética nos dias 7, 8 e 9, em que o dia 7 apresentou ponto de máxima de: 5,55. Enquanto observou-se efeito linear crescente significativo no dia 10. A densidade foi superior no sétimo dia quando comparado aos demais dias de crescimento.

Tabela 14. Composição química das larvas e *frass* e o balanço de nitrogênio, de larvas alimentadas com dietas com teores crescentes de proteína bruta e abatidas em diferentes dias de crescimento

Variável	Teor de proteína dietética (%)						Dias					p-valor			
	6	13	16	19	21	SE	7	8	9	10	SE	PB*D	D	PB-L	PB-Q
MSL (%)	23,43	23,87	24,44	26,01	25,93	0,28	21,32	24,81	25,41	27,39	0,25	<,005	<,005	<,005	0,0394
MSF (%)	49,75	61,36	64,97	67,04	64,50	0,87	39,53	59,56	73,12	73,89	0,78	<,005	<,005	<,005	<,005
PBL (%)	31,40	36,84	38,51	39,35	39,27	0,31	35,90	37,60	36,78	38,02	0,27	<,005	<,005	<,005	<,005
PBF (%)	5,98	10,06	12,84	15,54	17,32	0,30	12,01	12,91	11,88	12,60	0,26	0,7158	<,005	<,005	0,0203
EEL (%)	25,51	28,17	30,10	32,29	30,45	0,43	27,35	28,23	29,42	32,23	0,39	<,005	<,005	<,005	0,0229
gNL/Kg MS	0,42	1,05	1,31	1,60	1,69	0,02	1,26	1,17	1,19	1,24	0,02	<,005	<,005	<,005	0,0061
gNF/Kg MS	0,93	1,05	1,23	1,38	1,35	0,04	1,20	1,25	1,15	1,15	0,04	0,1759	0,2574	<,005	0,6523
PerdaN (%)	-8,31	19,60	11,09	15,40	22,21	2,20	10,95	9,91	14,88	12,34	1,96	0,0704	0,3005	<,005	<,005
EUNL (%)	33,84	40,13	45,90	45,43	43,21	0,88	42,64	40,60	40,91	42,65	0,79	<,005	0,1271	<,005	<,005
EUNF (%)	74,47	40,28	43,00	39,17	34,58	2,08	46,41	49,59	44,20	45,01	1,86	0,2093	0,1873	<,005	<,005

MSL: Matéria seca larval; MSF: Matéria seca do *frass*; PBL: Proteína bruta larval; PBF: Proteína bruta do *frass*; EEL: Extrato etéreo larval; gNL/Kg MS: Nitrogênio larval (g); gNF/Kg MS: Nitrogênio do *frass* (g); PerdaN: Perda de Nitrogênio; EUNL: Eficiência do uso de nitrogênio larval; EUNF: Eficiência do uso de nitrogênio pelo *frass*.

Houve interação significativa entre teor de PB e dia ($p<0,05$) sobre MSL, MSF, PBL, EEL, gNL/Kg MS e EUNL. Desta forma, os dias de crescimento foram desdobrados e os efeitos avaliados por meio de regressão.

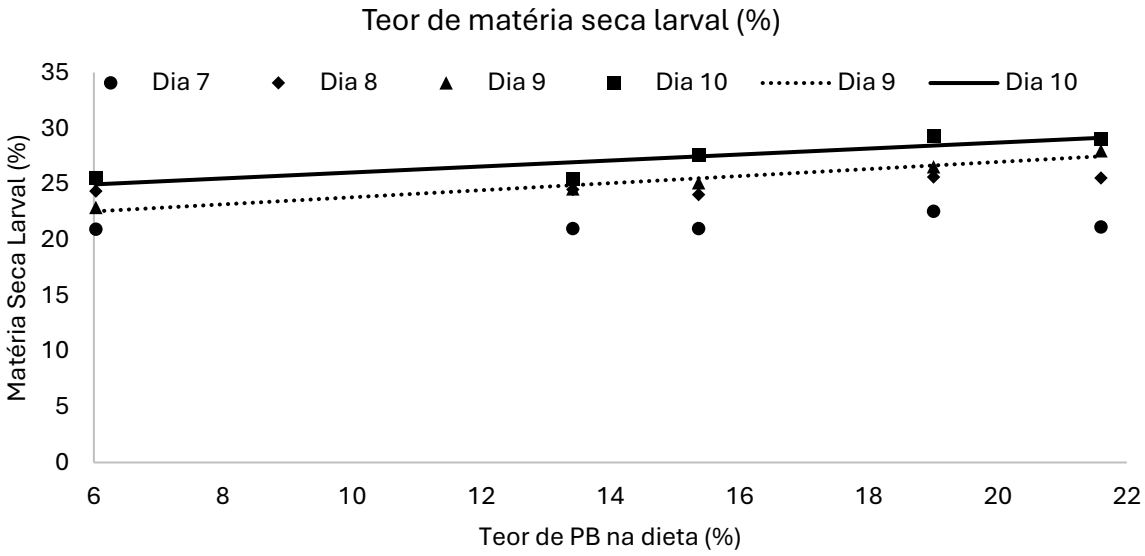


Figura 17. Regressões do teor de MS larval (%), de larvas alimentadas com dietas com teores crescentes de proteína bruta e abatidas em diferentes dias.

Tabela 15. Parâmetros da equação de regressão do teor em matéria seca larval (%)

Dia	c	b	p-valor - L	R^2 - L	p-valor- Q	R^2 - Q
7	-	-	>0,05	-	0,9920	-
8	-	-	>0,05	-	0,2446	-
9	20,631	0,317	<,0001	0,9552	0,1622	-
10	23,347	0,2683	<,0001	0,7467	0,1161	-

b = Inclinação; c = Intercepto R^2 – L = Coeficiente de determinação linear e R^2 – Q = Coeficiente de determinação quadrático

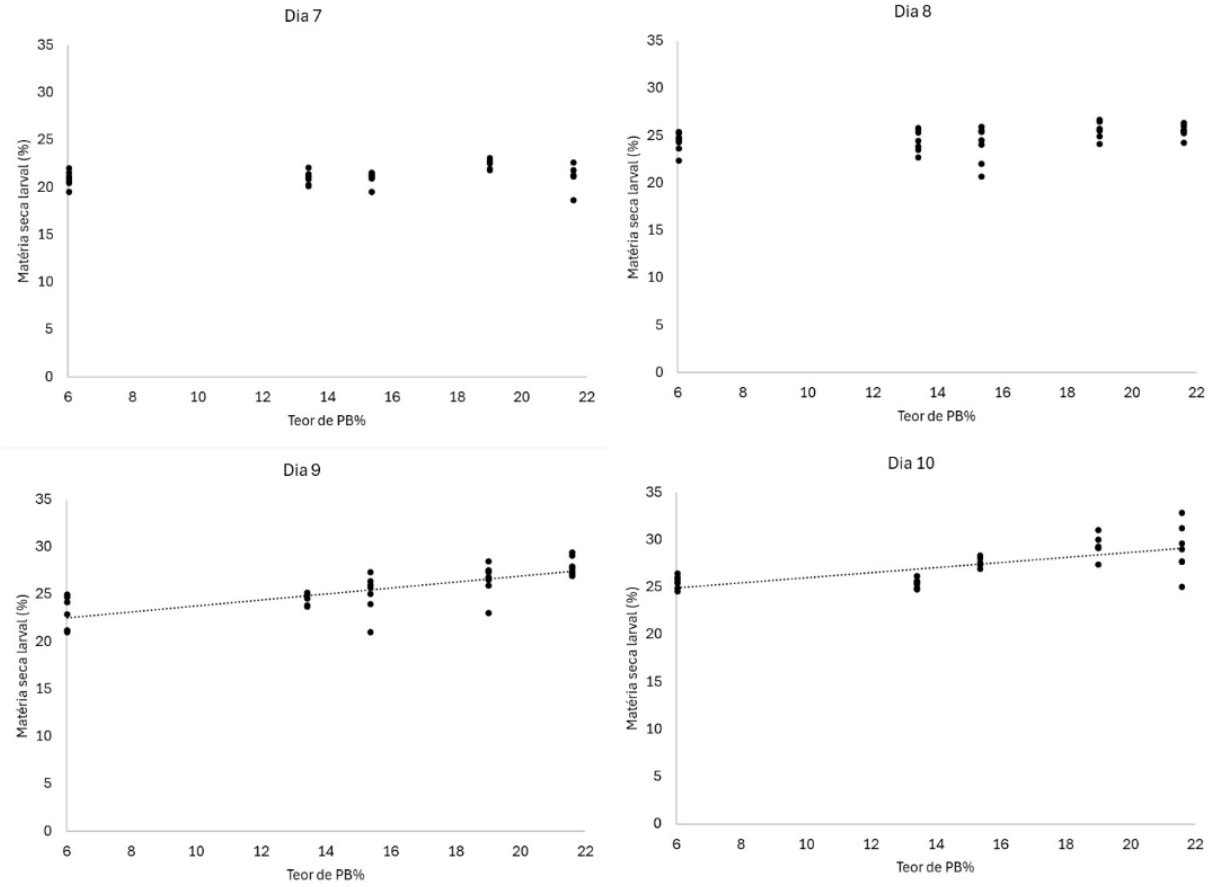


Figura 18. Regressões da matéria seca larval (%), por dia, de larvas alimentadas com dietas com teores crescentes de proteína bruta e abatidas em diferentes dias.

Quanto o teor de MS larval (%), não houve associação ($p>0,05$) entre os teores crescentes de proteína que pudesse ser descrita por regressão nos dias 7 e 8. Contudo, houve interação significativa linear entre teor de PB e dia ($p<0,05$) nos dias 9 e 10. Sendo o dia 10 o que apresentou superior teor de MS larval para todos os teores de proteína estudados.

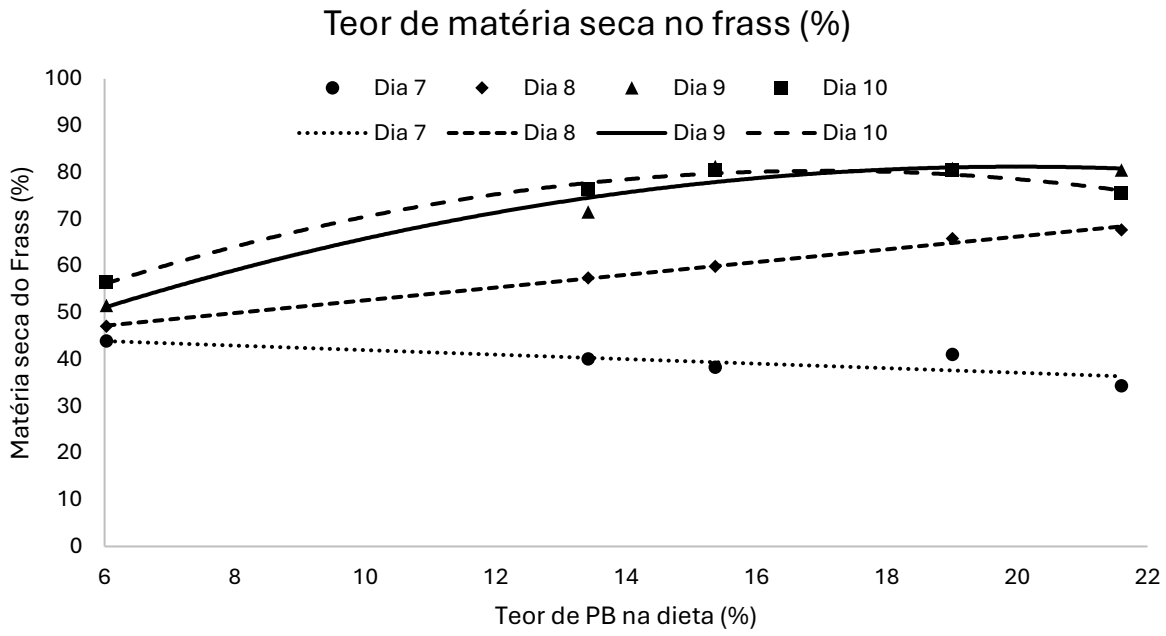


Figura 19. Regressões do teor de MS do *frass* (%), de larvas alimentadas com dietas com teores crescentes de proteína bruta e abatidas em diferentes dias.

Tabela 16. Parâmetros da equação de regressão do teor de matéria seca do *frass* (%)

Dia	c	b	a	p-valor L	R^2 - L	p-valor Q	R^2 - Q
7	46,814	-0,4827	-	0,0049	0,6625	0,7418	-
8	39,025	1,3615	-	<,0001	0,9948	0,7798	-
9	19,742	6,1476	-0,1537	<,0001	-	<,0001	0,9684
10	22,615	6,7818	-0,1993	<,0001	-	<,0001	0,9905

a = Coeficiente Quadrático; b = Inclinação; c = Intercepto; R^2 – L = Coeficiente de determinação linear e R^2 – Q = Coeficiente de determinação quadrático

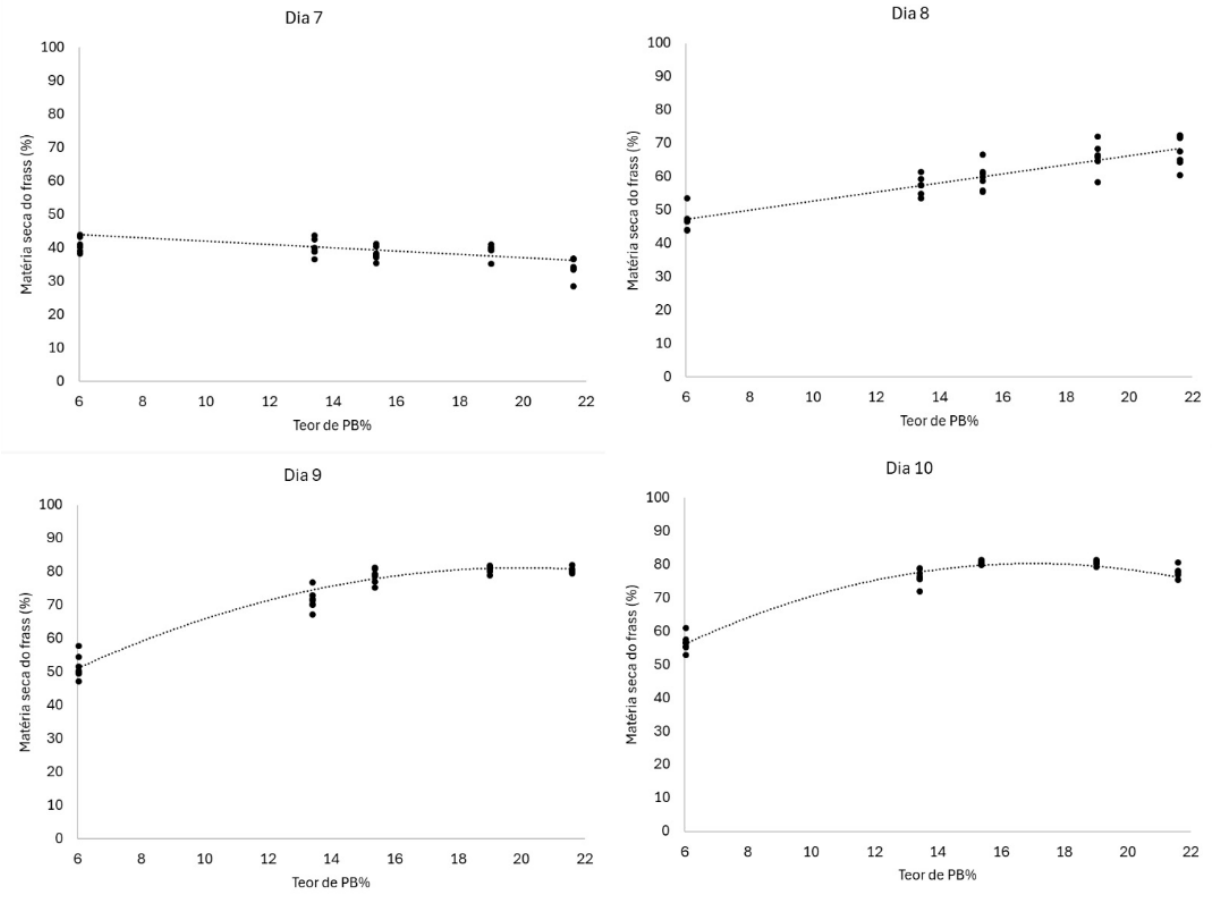


Figura 20. Regressões do teor de MS do *frass* (%), por dia, de larvas alimentadas com dietas com teores crescentes de proteína bruta e abatidas em diferentes dias.

Quanto o teor de MS do *frass* (%), houve interação significativa entre teor de PB e dia ($p<0,05$). Observou-se efeito linear significativo nos dias 7 e 8, enquanto houve efeito quadrático significativo nos dias 9 e 10.

No dia 7, o *frass* ainda apresenta alto teor de MS, variando de 43,67 a 28,54%, do tratamento de 6 e 22%, respectivamente. Logo, tratava-se de um substrato muito úmido. Enquanto a partir do dia 8, a MS *frass* atingiu valores médios de 60%. Sendo mais elevado nas dietas de 19 e 22% principalmente. Fato que facilita a separação mecânica. E a partir deste mesmo dia, a dieta de 6% apresentou sempre o menor teor de MS, devido ao excesso de água inicial, que reduziu a sobrevivência larval e afetou a cinética de secagem do *frass.*

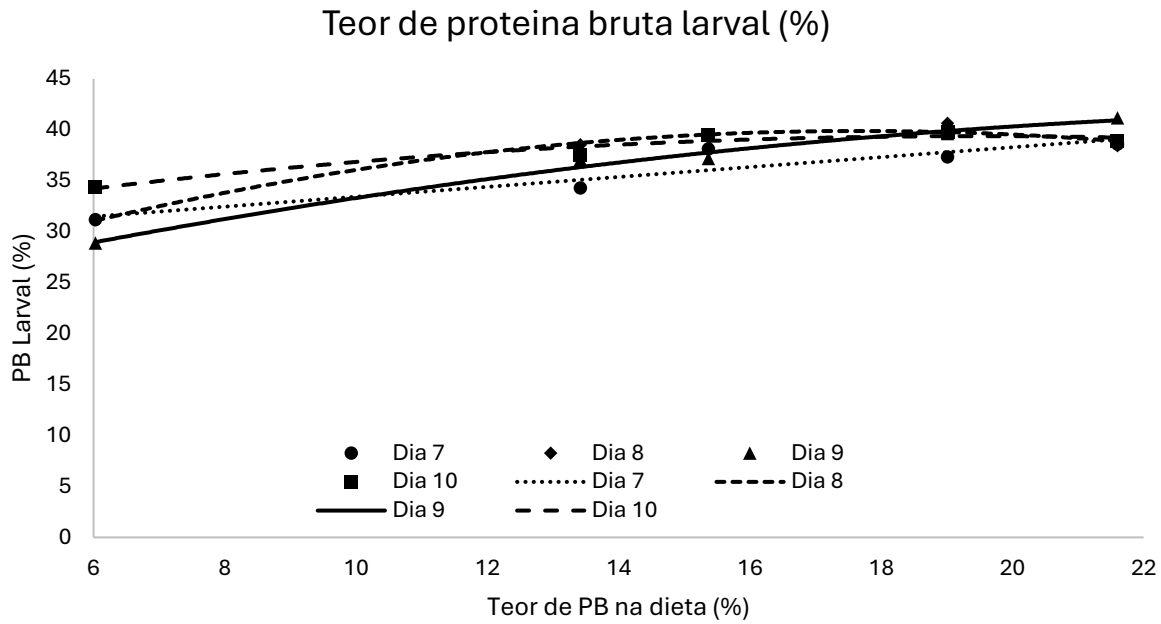


Figura 21. Regressões do teor de PB larval (%), de larvas alimentadas com dietas com teores crescentes de proteína bruta e abatidas em diferentes dias.

Tabela 17. Parâmetros da equação de regressão do teor de PB larval (%)

Dia	c	b	a	p-valor L	R^2 – L	p-valor Q	R^2 - Q
7	28,571	0,4857	-	<,0001	0,8586	0,1275	-
8	19,64	2,2905	-0,0648	<,0001	-	<,0001	0,9800
9	20,719	1,5379	-0,0279	<,0001	-	0,0087	0,9885
10	28,6	1,1105	-0,0286	<,0001	-	0,0072	0,9254

a = Coeficiente Quadrático; b = Inclinação; c = Intercepto; R^2 – L = Coeficiente de determinação linear e R^2 – Q = Coeficiente de determinação quadrático

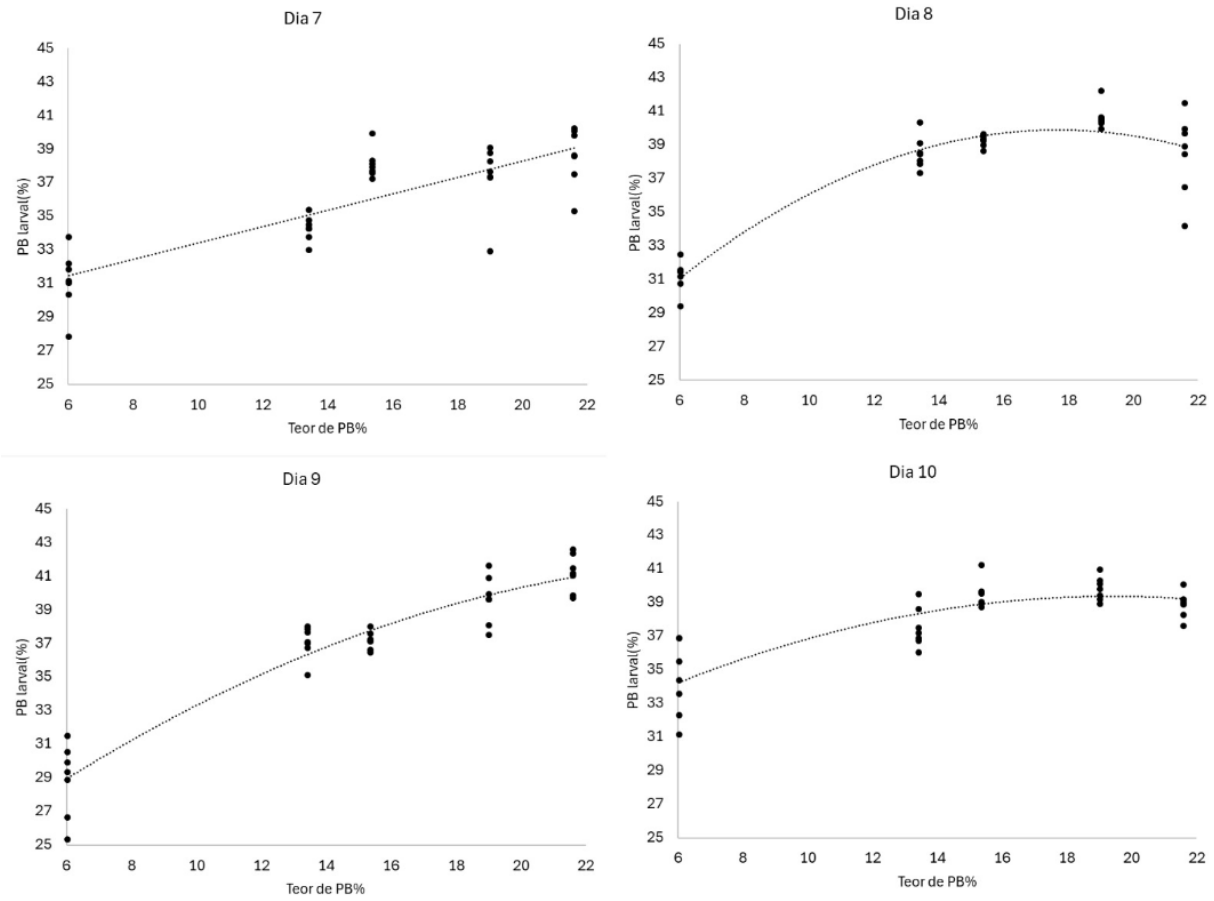


Figura 21. Regressões do teor de PB larval (%), por dia, de larvas alimentadas com dietas com teores crescentes de proteína bruta e abatidas em diferentes dias.

Quanto ao teor de PB larval (%) houve interação significativa entre teor de PB e dia ($p<0,05$). Observou-se efeito linear significativo positivo crescente para o teor de PB na larva à medida que se elevou o teor de PB dietético ($p<0,05$) no dia 7, com valores variando de 27,83 a 40,22. Enquanto efeitos quadráticos significativos ($p<0,05$) foram observados nos dias 8, 9 e 10, com valores de máxima de 39,88; 41,9 e 39,38 respectivamente.

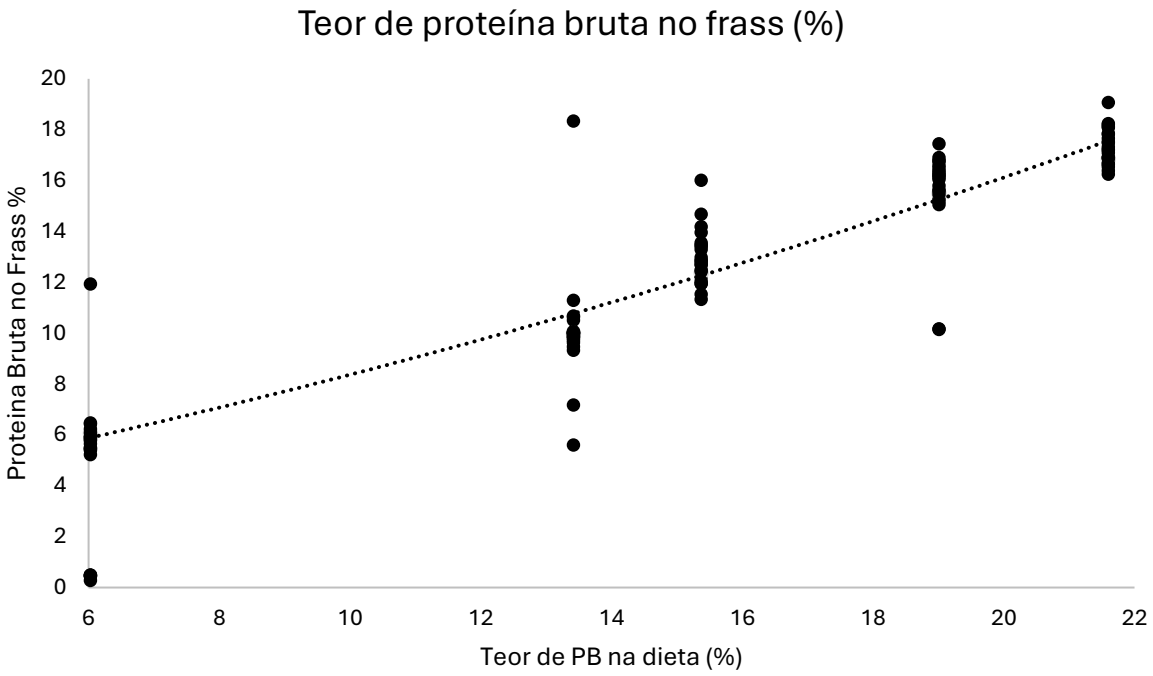


Figura 22. Regressões da proteína bruta do *frass* (%) de larvas alimentadas com dietas com teores crescentes de proteína bruta.

Tabela 18. Parâmetros da equação de regressão da proteína bruta no *frass* (%)

c	b	a	p-valor L	p-valor Q	R^2 - Q
2,7754	0,4511	0,0108	<,0001	0,0203	0,9878

a = Coeficiente Quadrático; b = Inclinação; c = Intercepto; R^2 – Q = Coeficiente de determinação quadrático

Quanto ao teor de proteína bruta no *frass*, não houve interação significativa entre teor de PB e dia (p= 0,7125). Observou-se efeito simples significativo do teor de proteína dietética (p<0,05) com significância quadrática (p<0,05).

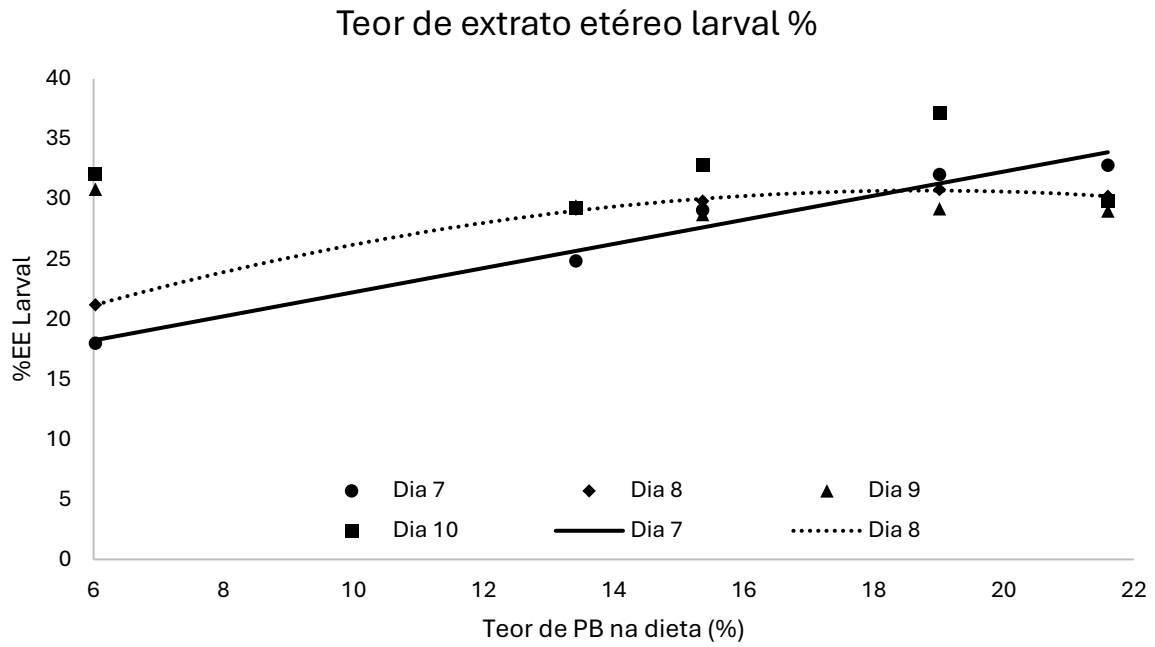


Figura 23. Regressões do teor de extrato etéreo (%) de larvas alimentadas com dietas com teores crescentes de proteína bruta e abatidas em diferentes dias.

Tabela 19. Parâmetros da equação de regressão do teor de extrato etéreo larval (%)

Dia	c	b	a	p-valor L	R^2 - L	p-valor Q	R^2 - Q
7	12,2	1,004	-	<,0001	0,9691	0,2552	-
8	10,083	2,1955	-0,0585	<,0001	-	<,0001	0,999
9	-	-	-	0,1498	-	0,3828	-
10	-	-	-	0,3744	--	0,7207	-

a = Coeficiente Quadrático; b = Inclinação; c = Intercepto; R^2 – L = Coeficiente de determinação linear e R^2 – Q = Coeficiente de determinação quadrático

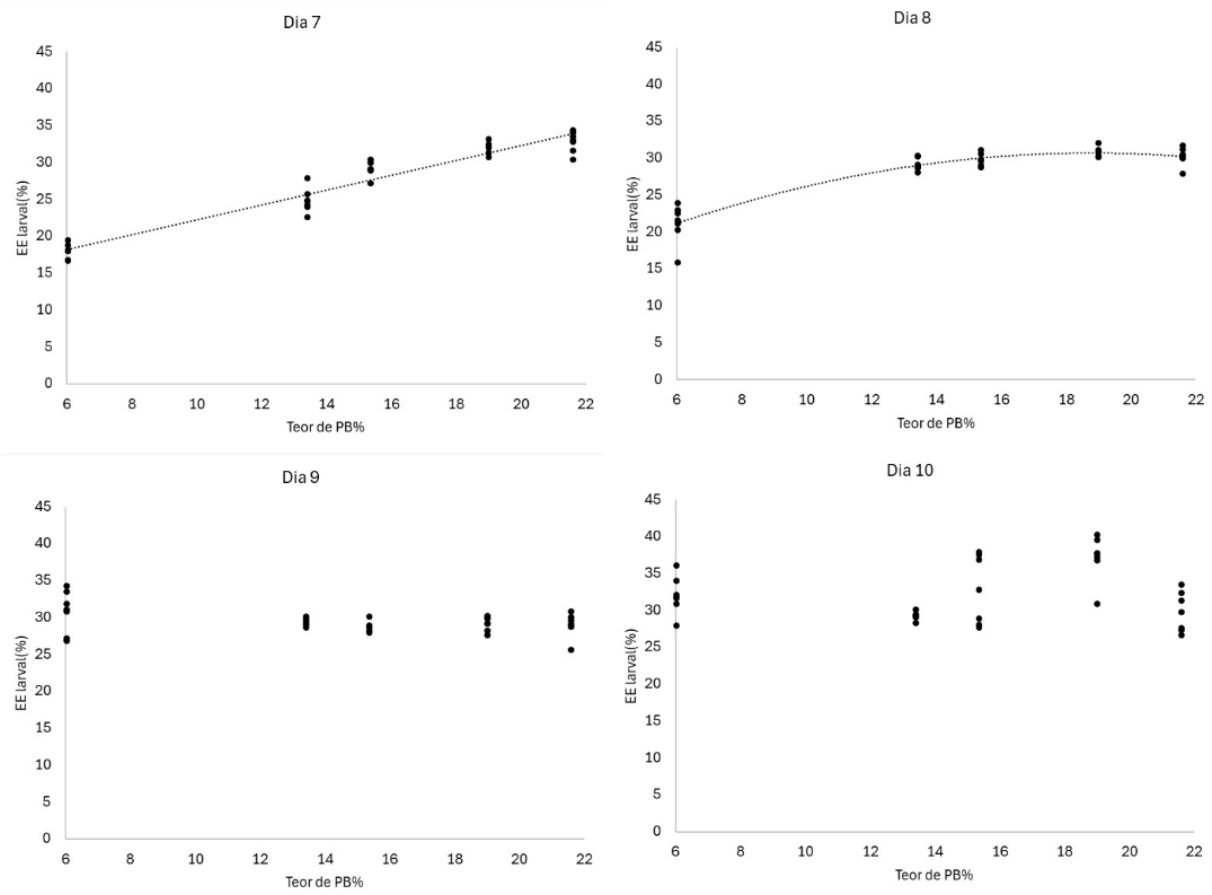


Figura 24. Regressões do teor de extrato etéreo larval (%), por dia, de larvas alimentadas com dietas com teores crescentes de proteína bruta e abatidas em diferentes dias.

Quanto ao teor extrato etéreo larval (%), observou-se interação significativa entre teor de PB e dia ($p<0,05$). Observou-se resposta linear crescente de retenção de extrato etéreo nas larvas em função do aumento da PB dietética no sétimo dia. Observou-se resposta quadrática no oitavo dia, com ponto de máxima estimado de 30,68% de EE. Enquanto não houve ajuste de regressão ($p>0,05$) nos dias 9 e 10, com valores médios de 29,41 e 32,22 %, respectivamente.

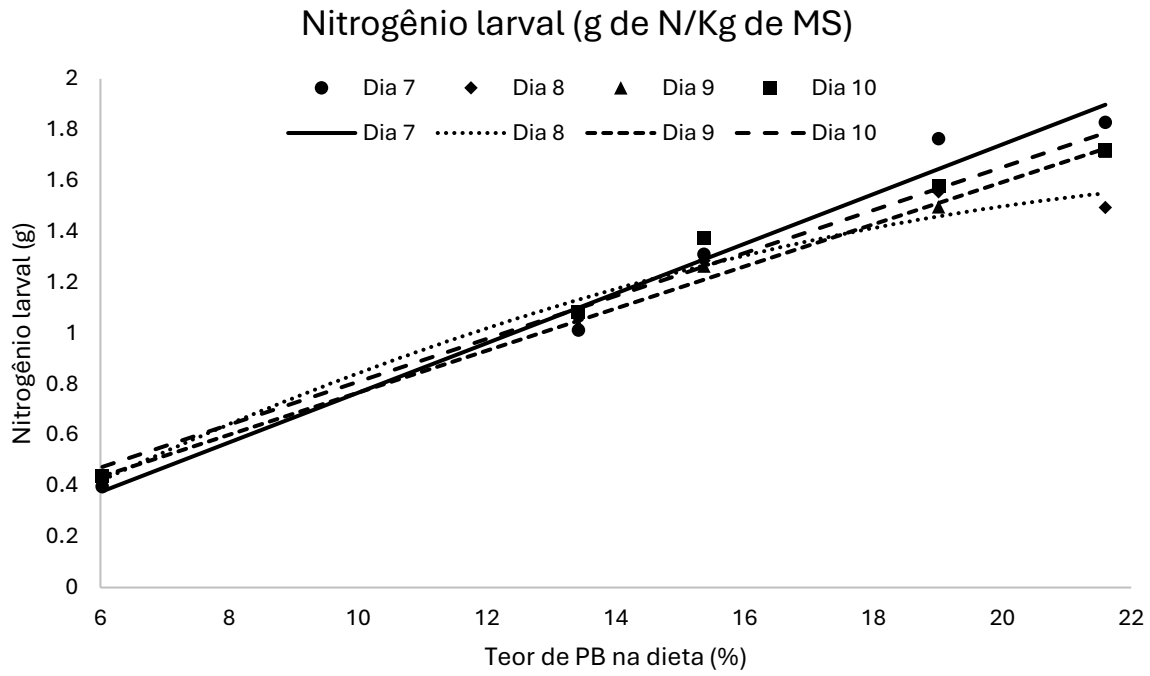


Figura 25. Regressões da massa de nitrogênio larval (g de N/Kg de MS) obtido de larvas alimentadas com dietas com teores crescentes de proteína bruta e abatidas em diferentes dias.

Tabela 20. Parâmetros da equação de regressão do teor de nitrogênio larval (g de N/Kg de MS)

Dia	c	b	p-valor - L	R^2 - L	p-valor– Q	R^2 - Q
7	-0,2103	0,0976	<,0001	0,9801	0,9637	-
8	0,0587	0,0734	<,0001	0,9424	0,0014	-
9	0,0611	0,0827	<,0001	0,9964	0,6238	-
10	-0,0344	0,0843	<,0001	0,9822	0,0629	-

b = Inclinação; c = Intercepto R^2 – L = Coeficiente de determinação linear e R^2 – Q = Coeficiente de determinação quadrático

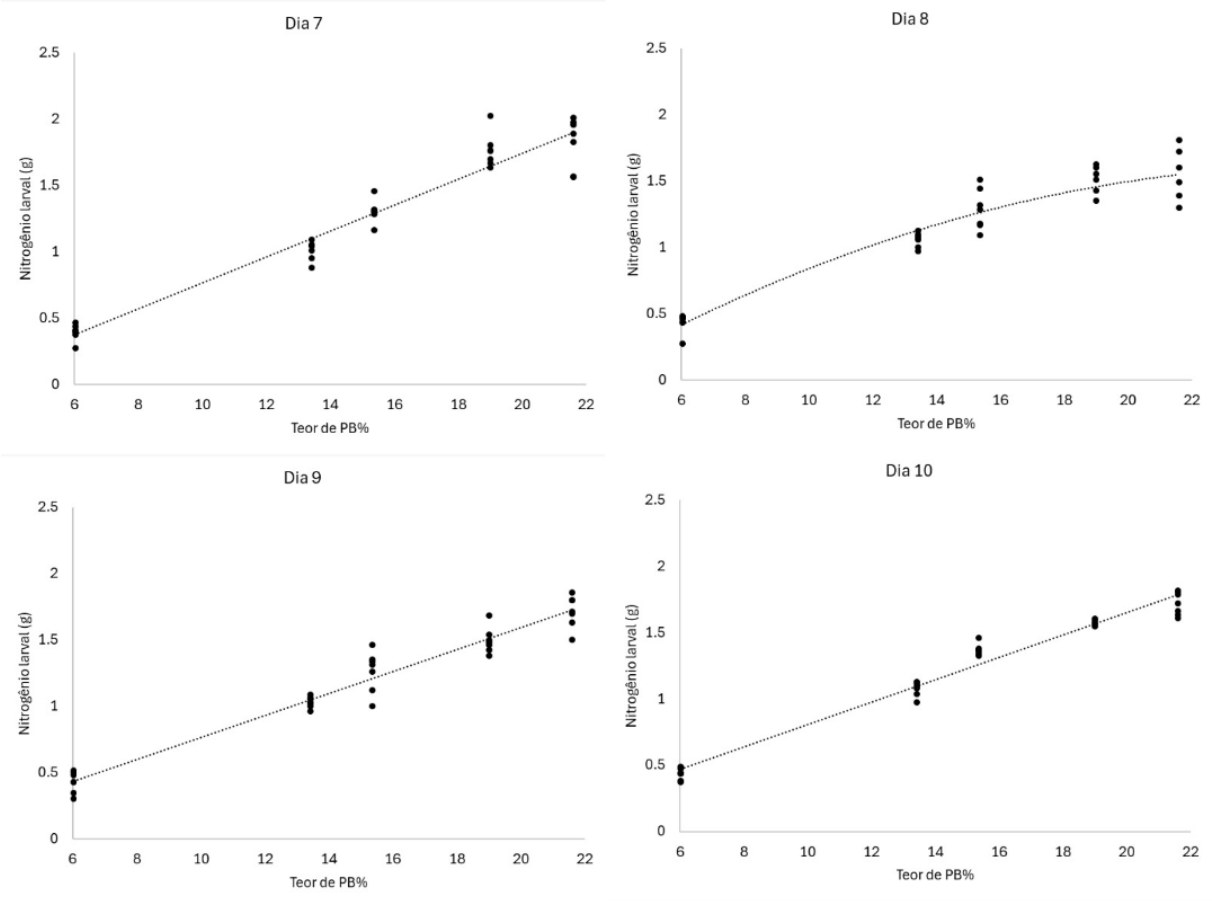


Figura 26. Regressões do nitrogênio larval (g de N/Kg de MS), por dia, de larvas alimentadas com dietas com teores crescentes de proteína bruta e abatidas em diferentes dias.

Houve interação significativa entre teor de PB e dia ($p<0,05$). Efeito lineares significativos crescentes foram observados em todos os dias, exceto no dia 8 que apresentou comportamento quadrático. O dia 7 apresentou desempenho superior quando comparado aos demais dias, com acúmulos máximos de 1,64 e 1,90 g de N nas dietas de 19 e 22% de PB%, respectivamente. Nos dias seguintes todos apresentaram redução na retenção de N, sendo o décimo dia o de superior intensidade de perda.

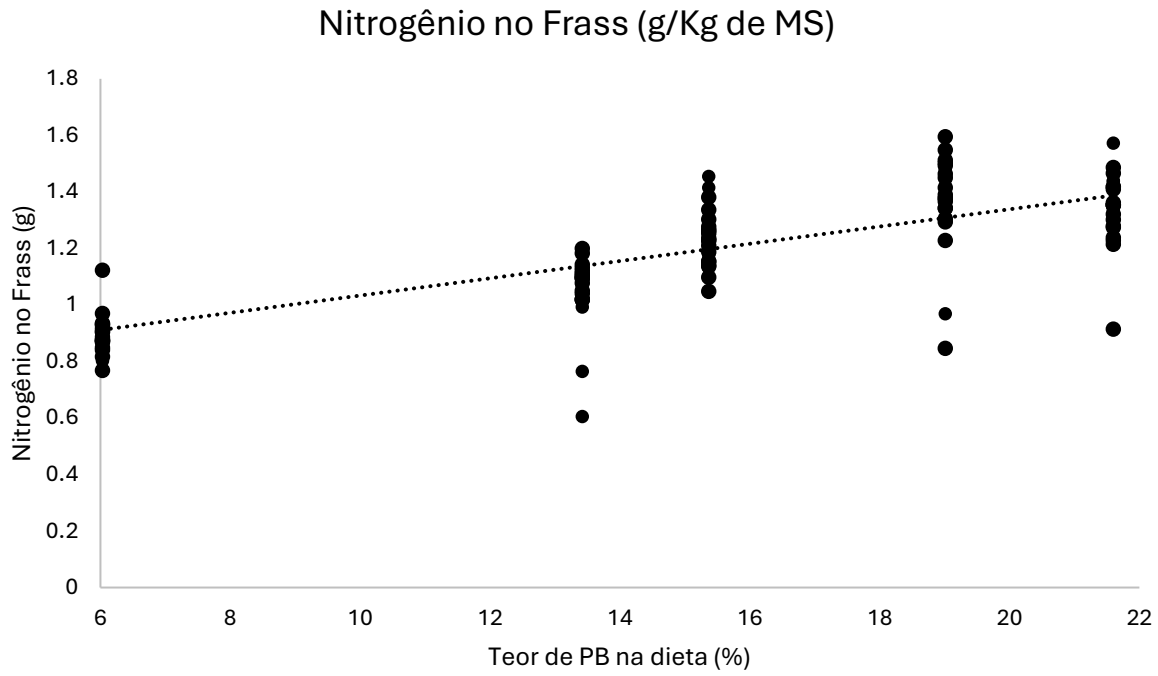


Figura 27. Regressões do teor de nitrogênio no *frass* (g de N /Kg de MS) proveniente de larvas alimentadas com dietas com teores crescentes de proteína bruta.

Tabela 21. Parâmetros da equação de regressão do teor de nitrogênio no *frass* (g)/Kg de MS

c	b	p-valor L	p-valor Q	R^2 - L
0,7280	0,0305	<,005	0,6523	0,8983

b = Inclinação; c = Intercepto; R^2 – L = Coeficiente de determinação linear

Não houve interação significativa entre teor de PB e dia (p>0,05), porém observou-se efeito simples dos teores de PB dietética. Identificou-se efeito linear positivo sobre o teor de nitrogênio no *frass* (p<,005).

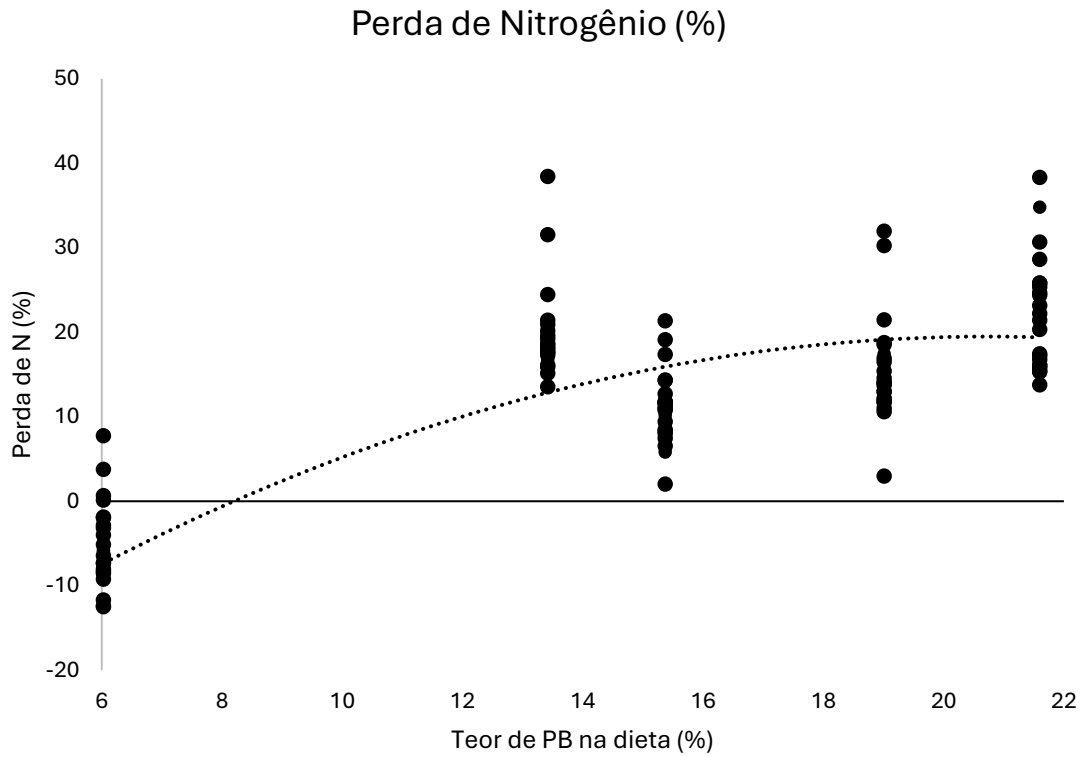


Figura 28. Regressões da perda de nitrogênio (%) de larvas alimentadas com dietas com teores crescentes de proteína bruta e abatidas em diferentes dias.

Tabela 22. Parâmetros da equação de regressão da perda de nitrogênio (%)

c	b	a	p-valor L	p-valor Q	R^2 - Q
-33,868	5,1495	-0,1242	<.0001	0,0020	0,8440

a = Coeficiente Quadrático; b = Inclinação; c = Intercepto; R^2 – Q = Coeficiente de determinação quadrático

Quanto a perda de nitrogênio (%), não houve interação significativa entre teor de PB e dia ($p>0,05$), porém observou-se efeito simples significativo ($p<0,05$) dos teores de PB dietética. Observou-se efeito quadrático significativo com ponto de máxima estimado em 19,51%.

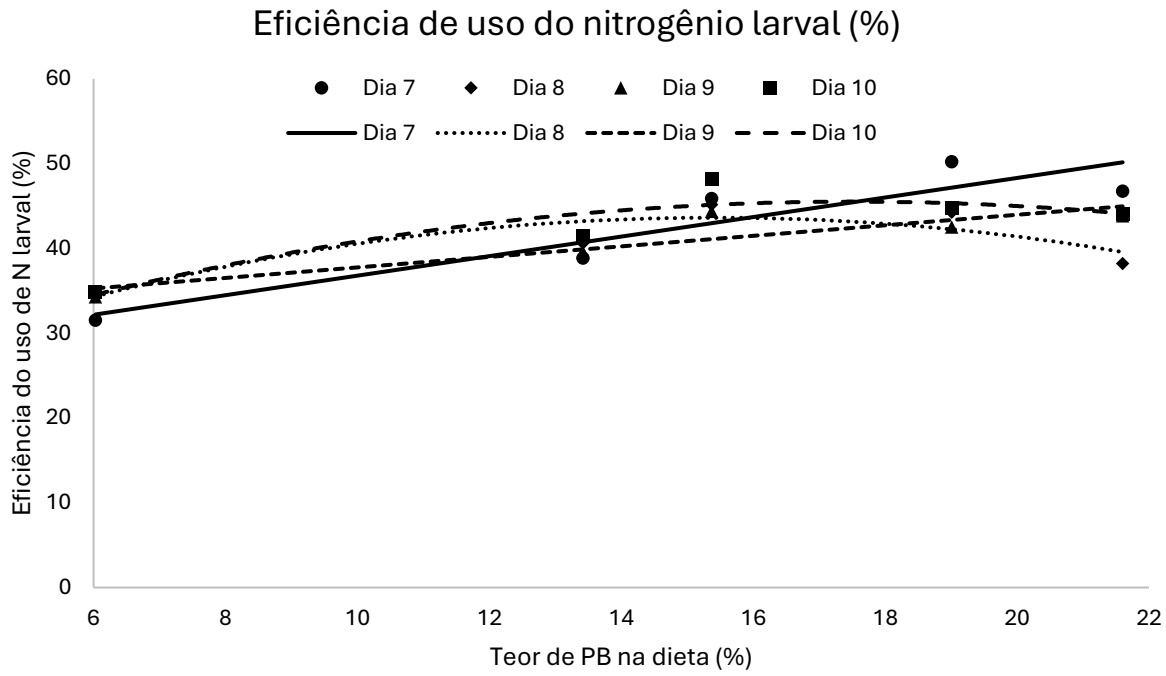


Figura 29. Regressões da eficiência de uso do nitrogênio larval (%) em larvas alimentadas com dietas com teores crescentes de proteína bruta e abatidas em diferentes dias.

Tabela 23. Parâmetros da equação de regressão da eficiência do uso de nitrogênio larval (%)

Dia	c	b	a	p-valor L	R^2 - L	p-valor Q	R^2 - Q
7	25,262	1,1523	-	<,0001	0,8505	0,1438	-
8	18,61	3,2468	-0,1054	0,0389	-	0,0008	0,7968
9	31,544	0,6211	-	0,0007	0,7986	0,1832	-
10	20,014	2,9126	-0,0832	0,0004	-	0,0078	0,8307

a = Coeficiente Quadrático; b = Inclinação; c = Intercepto; R^2 – L = Coeficiente de determinação linear e R^2 – Q = Coeficiente de determinação quadrático

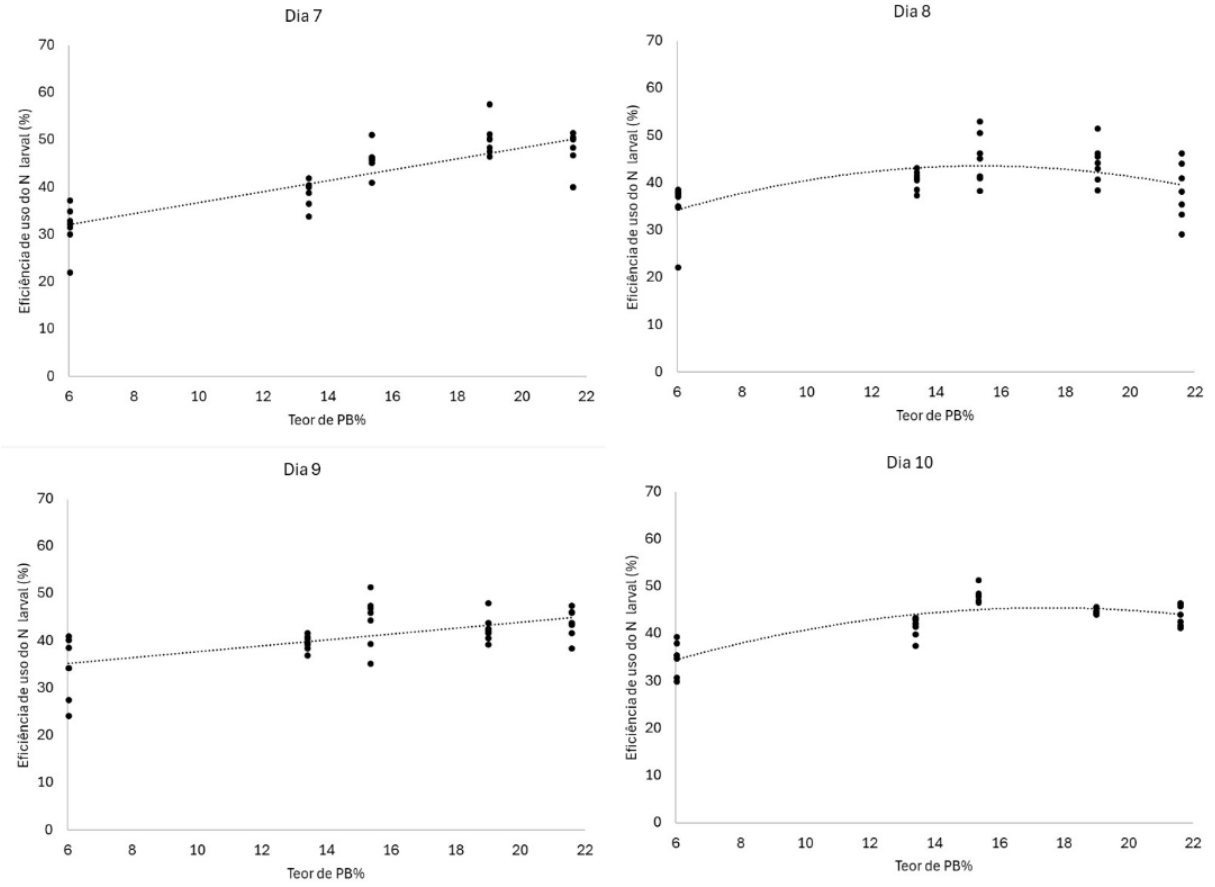


Figura 30. Regressões da eficiência de uso do N larval (%), por dia, de larvas alimentadas com dietas com teores crescentes de proteína bruta e abatidas em diferentes dias.

Quanto a eficiência de uso do nitrogênio larval, houve interação significativa entre teor de PB e dia ($p<0,05$). Foram observados efeitos lineares significativos crescentes nos dias 7 e 9. Enquanto efeitos quadráticos no oitavo e décimos dias, com pontos de máxima eficiência de uso do nitrogênio larval estimados em 43,6% e 45,5% respectivamente. O dia 7 apresentou desempenho superior quando comparado aos demais dias, com eficiências máximos de 47,2% e 50,1% nas dietas de 19,01 e 22% de PB, respectivamente.

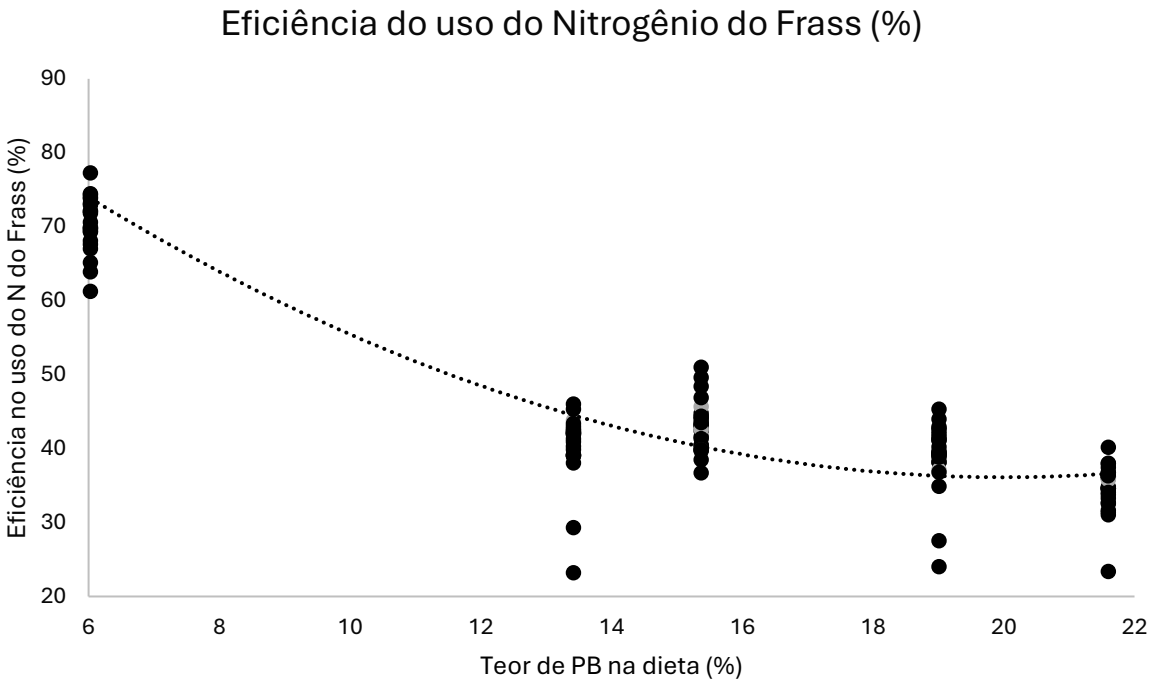


Figura 31. Regressões da eficiência do uso do nitrogênio pelo *frass* (%), de larvas alimentadas com dietas com teores crescentes de proteína bruta e abatidas em diferentes dias.

Tabela 24. Parâmetros da equação de regressão da eficiência do uso de nitrogênio no *frass* (%)

c	b	a	p-valor L	p-valor Q	R^2 - Q
113,36	-7,7205	0,1929	<.0001	<.0005	0,9631

a = Coeficiente Quadrático; b = Inclinação; c = Intercepto; R^2 – Q = Coeficiente de determinação quadrático

Quanto a eficiência do uso de nitrogênio no *frass*, não houve interação significativa entre teor de PB e dia (p>0,05), porém observou-se efeito simples dos teores de PB dietética e identificou-se efeito quadrático negativo (p<,005), com o ponto de mínima estimado de 36,1%. Em que houve queda brusca até o teor de 15% PB e em seguida o surgimento de um platô.

3.4 DISCUSSÃO

Metodologias de determinação de exigência nutricional por diluição de dieta são práticas comuns na experimentação animal (Leeson; Summers; Caston, 1992). A *Hermetia illucens* vive imersa no substrato que consome e, portanto, somente a utilização do amido inviabilizaria o uso deste método no cultivo de larvas. Desta forma, associou-se a fibra de coco com o amido (50:50) para causarem o efeito de diluição nutricional do RPCH, visto que as características físico-químicas do substrato devem ser consideradas na experimentação com LMSN, assim como a textura e aeração (Bosch et al., 2020; Bekker et al., 2021). A fibra de coco impediu que todo o amido precipitasse. Além disso, apresenta o potencial de adsorção de água do substrato (Niu et al., 2023), reduzindo a mortalidade das larvas L_1, seja por afogamento ou pela falta de amido disponível na superfície. Outra característica das dietas que deve ser destacado é o teor de proteínas insolúveis em detergente neutro (PIDN%) (Huyler; Kincaid, 1999). As larvas não digerem fibra e dependem de sua microbiota intestinal para degradar parte do conteúdo fibroso (Bonelli et al., 2020; Bruno et al., 2025a), todo nutriente intrinsicamente associado a ela, estará, indisponível para a digestão e absorção. Neste estudo, os teores de PIDN foram de 1,8 a 2,2% do total proteico dietético. Proporcionalmente, houve mais proteína indisponível nas dietas de 6 e 22% de PB, tornando-se as mais restritivas.

Na fase de cria avaliada, as larvas estavam em plena ascensão na curva de crescimento (Matheka et al., 2021; Okeyo; Wandera; Messo, 2024). Portanto, por sete dias, as dietas contendo teores de proteína entre 19 e 22% foram suficientes para garantir o máximo da produção de massa seca larval. Logo, a queda de ganho de massa observada entre os dias 8 e 10, não significa que se atingiu o crescimento fisiológico máximo, mas sim que houve restrição de nutrientes potencialmente digestíveis no substrato (Tomberlin et al., 2023).

Adicionalmente, deseja-se maximizar a bioconversão do RPCH em modelos sustentáveis de produção de LMSN (Wang et al., 2024; Chapagaee et al., 2025), que foi estimada em 27,2% no sétimo dia de cria. A bioconversão de resíduos orgânicos é amplamente descrita na literatura e variam entre 1,1 e 25,5% (Qin et al., 2022; Peguero et al., 2023; Siddiqui et al., 2025), com o uso de diferentes resíduos. Porém, poucos estudos aprofundaram a viabilidade de uso do RPCH obtido por coletas seletivas e descrevem bioconversões de 10 a 19% a partir de resíduos como: alimentos coletados de restaurantes (Lalander et al., 2019), resíduos domésticos de frutas, vegetais, ovos etc. (Ewald et al., 2020; Bohm et al., 2022).

O presente estudo confirma a viabilidade de utilização do RPCH na cria, pois foi capaz de garantir conteúdos proteicos que permitiram maior sobrevivência e peso vivo das larvas por sete dias de criação. Neste período, não houve restrição nutricional e os ganhos de peso responderam linearmente de forma crescente com a inclusão de proteína, atingindo máximos valores de 25,5 mg de PV, na dieta de 22% de PB. Evidenciando que sistemas de produção de LMSN, que adotam múltiplas alimentações, devem considerar superiores necessidades em proteína nesta fase de criação (Dzepe et al., 2021; Schneider et al., 2025a). Reforçado pelo fato de que o perfil de resposta linear de ganho de peso manteve-se até o sétimo dia, o que indica que, entre os dias 8 e 10, caso não houvesse restrição nutricional, a resposta linear de ganho poderia ter se mantido por mais tempo. Como demonstrado no estudo de Schneider et al. (2025b) e Seabra (2025), aos 7 dias pós-eclosão, há ganho de peso larval crescente, ascensão que se mantém por 14 dias de crescimento. Schneider *et al*., (2025a; 2025b) demonstraram que teores entre 15 e 20% de PB% dietética promoveram melhoras nos indicadores produtivos. Entretanto, estes estudos não contemplaram a fase de "cria", uma vez que utilizaram dietas de

crescimento para frangos até que as larvas atingissem 6 dias de idade, desconsiderando, assim, a maior exigência nutricional característica desta fase, como observada nos demais animais domésticos (NRC, 2021; Rostagno, H. S. *et al,* 2024; FEDIAF, 2024). Em contraste, o presente estudo incorpora esta etapa do ciclo produtivo, evidenciando maior demanda nutricional por meio do desempenho superior das larvas alimentadas com dietas contendo 19% e 22% de proteína bruta.

O controle da população larval definida pelo número de indivíduos por cm^2 ou cm^3 nas unidades de criação auxilia o manejo alimentar. Segundo Bosch et al. (2020) e Yakti *et al*., (2022) a recomendação de densidade é de 6,25 cm^2. O modelo de criação em caixas sobrepostas é adotado por muitas biofábricas, que através da densidade, conseguem administrar a quantidade de alimento/ unidade de criação (Ogello et al., 2025). No presente estudo, a mesma massa de ovos foi utilizada em todas as dietas, contudo, a mortalidade foi superior na dieta contendo 6% de PB. Devido às limitações físico-químicas do substrato, sendo ela a textura ou a restrição nutricional que limitou a sobrevivência das larvas (Schneider et al., 2025), causando menor número total de larvas em todos os dias avaliados com consequências de redução dos indicadores de produção.

O pico da densidade larval foi observado no sétimo dia, totalizando aproximadamente 5271 e 5842 indivíduos nas dietas contendo 22% e 19% de PB. As L_1 são muito pequenas, com peso médio de 0,03mg (Seyedalmoosavi et al., 2022) e possuem baixa capacidade de penetração no substrato, logo, colonizam principalmente a superfície (Yakti et al., 2023; Zhang; Puniamoorthy, 2025). Nesta fase, justificaria descrever a densidade por área (cm^2), entretanto, rapidamente penetram no substrato úmido, dispondo de superfície tridimensional. Larvas de 4 dias alimentam-se penetrando no substrato (Bekker et al., 2021; Yakti et al., 2023), portanto, a mensuração de densidade por área pode superestimar a densidade, pois não se contabiliza a altura do substrato disponível para a alimentação, logo, justifica-se descrever a densidade pelo volume útil do substrato de criação. Neste estudo, não foi o objetivo estabelecer recomendações de densidade para a cria, contudo, evidenciou-se que nos sistemas de produção que adotam duas fases de criação, as densidades que permitem otimizar o sistema serão distintas e, obrigatoriamente, devem ser ajustadas para atender o suprimento das necessidades nutricionais.

Como consequência da alimentação, a composição química das larvas se altera (Hopkins et al., 2021) e, quando estão aptas para o abate, as larvas vivas apresentam teor matéria seca de 30-20% (Meneguz et al., 2018). Na fase de cria, o pico no teor de matéria seca foi observado no sétimo dia na dieta contendo 19% de PB com valor de 26%. Ao longo dos dias, observou-se aumento no teor de matéria seca larval que esteve entre 21 e 27%. Como houve redução da produção de massa (g) larval associada a elevação do teor de MS larval por efeito dos dias de crescimento. Justifica-se que a ventilação artificial associada a restrição nutricional, permitiram condições para que os indivíduos acelerassem a perda de água corporal e o consumo das reservas energéticas retidos na larva (Bekker et al., 2021), com consequente oscilações nos teores de matéria seca e da bioconversão em larva.

Industrialmente, o teor de MS do *frass* é indicador de sincronismo entre o desenvolvimento larval com a facilidade de separação mecânica. A etapa operacional é processo crítico de produção (Eggink; Donoso; Dalsgaard, 2023; Ogello et al., 2025), ainda mais importante em sistemas que adotam a cria e recria, pois, executarão a separação duas vezes. Ensaios laboratoriais possibilitam a separação manual para a coleta de dados, contudo,

a indústria depende de teores de MS do *frass* acima de 50% (Cheng; Chiu; Lo, 2017) para a separação eficiente. Apesar do sétimo dia de cria apresentar os melhores indicadores de produção, o teor de matéria seca do *frass* encontrava-se entre 44 e 34% de MS. Consequentemente, a separação somente foi possível, pois foi realizada experimentalmente. Do oitavo dia em diante, somente a dieta contendo 6% de PB apresentou teores baixos de umidade que dificultaram o procedimento. Dietas mais proteicas garantiram a sobrevivência das larvas, pois causaram o aumento da atividade metabólica e, quando associada ao comportamento gregário e a fermentação aeróbia microbiana, proporcionaram que a fase termofílica de produção de calor acelerasse com efeitos sobre a secagem do substrato para teores acima de 50% de MS (Klammsteiner et al., 2025).

Considerando as condições físico-químicas do substrato, no sétimo dia de cria, havia condições de manutenção da hidratação das larvas. Bem como nutrientes disponíveis para o consumo, que refletiram em resposta linear e crescente no teor (%) de proteína bruta retida na larva em função dos teores proteicos dietéticos. Sendo a maior resposta observada com a inclusão de 22% de PB que produziram larvas contendo 39% de PB. Após, efeitos quadráticos foram observados, indicando existência de pontos de máxima resposta de retenção proteica nas larvas de 39,9, 41,9 e 39,8% nos dias 8, 9 e 10, respectivamente. Os picos coincidem com teores de proteína dietética de 16% e 22%. Embora Oddon; Biasato e Gasco, (2022) tenham verificado superiores desempenhos produtivos em LMSN com o uso de dietas isoenergétiocas e semi-purificadas que variaram seu conteúdo em PB de 16 e 19%, os autores avaliaram o desempenho de larvas após os 6 dias, logo, após a fase de "cria". Desconsiderando o fato de que em fases iniciais os animais possuem superior exigência proteica (Rostagno *et al*., 2024; Ghaffari; Drackley; Kertz, 2025). Comprovando o suprimento da exigência nutricional para a categoria de cria até 7 dias com o uso de dietas compostas por RPCH.

A dieta de superior teor de PB 22% foi composta exclusivamente por RPCH que continha 14,5% de EE%. Pelo método experimental de diluição utilizado, houve redução progressiva do teor de PB e de EE na mesma proporção. Desta forma, o efeito linear crescente observado no dia 7 pode ser resultado da somatização dos efeitos do teor de proteína associado ao de EE. No oitavo dia, o comportamento de curva alterou e o ponto de máximo teor de EE% na larva foi de 30,7% observado nas larvas da dieta contendo 19% de PB. Não havendo possibilidades de ajustes nos dias seguintes que apresentaram médias de 29,4 e 32,2%, respectivamente. A restrição nutricional estimulou o consumo de reservas energéticas nas larvas, igualando os teores de EE entre as dietas nos dias finais de criação (Ewald et al., 2020; Schneider et al., 2025a). Segundo Oddon et al., (2022) dietas contendo 4,5% de EE promoveram melhores ganhos, sugerindo a possibilidade de aumento nos teores de inclusão. Os teores de EE das dietas mais proteicas foram adequados para a produção da LMSN e não afetaram a sobrevivência larval (Hadj Saadoun et al., 2020; Oddon et al., 2022). Devido a movimentação da larva e a penetração no substrato, a presença de uma fina camada de gordura dificultará a troca gasosa (Gabiatti et al., 2020; Yakti et al., 2023), portanto, há um limite de gordura dietética. Respeitar estes limites é fundamental quando se estuda a viabilidade do uso do RPCH, devendo-se realizar "blends" que possibilitam manter os teores de EE dentro do adequado. Dietas com teores acima de 20% de EE afetam o desenvolvimento larval (Ujvari et al., 2009; Nguyen; Tomberlin; Vanlaerhoven, 2013). A dieta de 6% PB restringiu o teor de EE disponível para as larvas, prejudicando a formação do corpo gorduroso, consequentemente, o ganho de peso (Barragan-Fonseca et al., 2018; Siddiqui et al., 2025).

O *frass* é coproduto da indústria de LMSN, resultante do processo de co-conversão do RPCH por atividade microbiana (Ogello et al., 2025) e da digestão das larvas, composto por fezes, microrganismos, exúvias, larvas mortas e alimento não consumido (Arabzadeh et al., 2022). Muito embora o *frass* possa ser utilizado para a alimentação de espécies domésticas devido ao seu conteúdo de N, trata-se de um co-produto (Yildirim-Aksoy; Eljack; Beck, 2020; Jasso et al., 2023). Quanto maior sua bioconversão e teor de proteína, pior serão os indicadores para a indústria, justificando a necessidade do correto manejo nutricional para as larvas nas diferentes fases de criação. Observou-se que tanto o aumento do N retido quanto da proteína presente no *frass* estão diretamente relacionados com o conteúdo proteico dietético. De forma que outros indicadores de produção devem ser considerados para identificar o adequado atendimento das exigências nutricionais em proteína para as larvas. Assim como a disponibilidade da proteína dietética, uma vez que é impossível calcular a digestibilidade dos alimentos através da experimentação com LMSN (Lee et al., 2026). Além disso, o balanço de nitrogênio que indica o excesso de proteína dietética, sendo necessário quantificar a produção de *frass* e seu valor nutricional.

Os resíduos orgânicos em deterioração na natureza (Hosseindoust et al., 2023) são fontes naturais de substratos para a LMSN e, a presença de microrganismos decompositores aeróbicos (Shao et al., 2024; Wang et al., 2024) são capazes de fixar nitrogênio aproveitando-se da relação C:N do substrato (Jesus et al., 2025). O RPCH utilizado neste estudo foi armazenado em condições aeróbicas o que permitiu a fixação de nitrogênio de forma homogênea para todos os tratamentos.

O N microbiano é essencial para o desenvolvimento da LMSN em fase inicial de L_1 (Shao et al., 2024). Muito embora tenha-se identificado balanço de nitrogênio negativo na dieta de 6% de PB, isto é, identificou-se a fixação nitrogenada microbiana. O total de proteína fixada associada a fração proteica potencialmente digestível da dieta de 6%, foram insuficientes para suprir as exigências do total de larvas de cria presentes no tratamento. Nesta dieta, foi inserida 0,96% de N, e houve a fixação de cerca de 10% de N bacteriano. Com menor número de indivíduos viáveis, houve redução do consumo do substrato que refletiu em aumentos na produção de *frass*.

O conteúdo proteico do RPCH foi capaz de influenciar linearmente o teor de N retido na larva em todos os dias avaliados. Com médias máximas observadas no sétimo dia de 1,6 e 1,9 g de N nas dietas de 19 e 22% de PB, respectivamente. Nos dias seguintes, os valores médios de retenção apresentaram queda, que possivelmente deve-se ao uso de proteína pelo metabolismo energético (Zhao et al., 2025). Como consequência da excreção nitrogenada fecal, esperava-se efeito dos dias no conteúdo de N no *frass*, que não foi observado. Possivelmente, uma fração nitrogenada foi volatilizada seja durante a cria ou durante a secagem do *frass*, unida a perda por excreção de amônia (Lee et al., 2026). A proporção de N fixado pela atividade microbiana (Shao et al., 2024) bem como o N volatilizado (Lee et al., 2026) são quantificações ainda pouco compreendidas no sistema de produção de LMSN.

O teor de nitrogênio no *frass* está diretamente associado à quantidade de proteína presente nas dietas, sendo, resultante da digestibilidade dos componentes nitrogenados dos alimentos (Lee et al., 2026). Parte do N dietético não está disponível para a larva, pois está associado a fração fibra indigestível (Ovani et al., 2022). O NIDN variou de 0,35 a 0,30% nas dietas, entretanto, aquelas de menor teor proteico continham superior fração em FDN devido a

inclusão da fibra de coco. Desta forma, relativamente, havia mais nitrogênio indisponível nas dietas menos proteicas. Adicionalmente, nos dias 7 e 8 havia mais N retido no *frass*, valores médios que reduziram e estabilizaram em 1,15g de N nos dias 9 e 10. Confirmando-se através da perda nitrogenada (%) o efeito do dia que estimulou a volatilização nitrogenada, estabilizando nos dias 9 e 10. A tendência descrita pelo efeito quadrático (Fig. 28) de perda nitrogenada em função da elevação do teor de proteína dietética, sugere o suprimento das necessidades nutricionais de proteína bruta na fase de cria (Schneider et al., 2025a, 2025b) entre os teores 19 e 22% de PB.

A eficiência de utilização do N larval foi superior no dia sete, com médias de 47,2% e 50,1% nas dietas de 19,0 e 22% de PB, respectivamente. Com tendência de estabilização do uso da proteína em dietas compostas por RPCH em 19% de PB, caracterizando o suprimento das necessidades nutricionais.

Sugerimos que nossos dados foram capazes de identificar a tendência de estabilização de uso da proteína dietética fixada na larva nesta fase de criação. Incrementos além dos teores de 22% de PB dietéticos serão direcionados para o *frass*, pois caso o excesso de consumo de proteína acarreta no aumento da excreção nitrogenada (Gärttling; Schulz, 2022; Tschirner; Simon, 2015). Volatilizações nitrogenadas ocorrerão elevando as possibilidades de contaminação ambiental (O'Donnell; Donini, 2017). Bem como aumentando os custos metabólicos da excreção de nitrogênio do inseto, fazendo com que a LMSN reduza o consumo alimentar (Nguyen; Tomberlin; Vanlaerhoven, 2013).

3.5 CONCLUSÕES

O aumento dos teores de proteína bruta dietética a base de resíduo pré-consumo humano na fase de cria promove melhores índices produtivos para larvas de *H. illucens*, com melhores desempenhos de larvas alimentadas com teores entre 19 e 22% de PB dietética. Sete dias de cria foram suficientes para atingir o máximo desempenho larval nas condições do presente estudo. Ocorre aumento de perdas nitrogenadas em função da elevação do teor de proteína, reduzindo o apelo ecológico da produção de insetos. A utilização de RPCH com teores adequados de PB% promovem aumento da sustentabilidade na produção de LMSN.

3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC - Association of Official Analytical Chemistry. 1995. Official methods of analysis. 16th ed. AOAC International, Arlington, VA.

ARABZADEH, Ghazaleh *et al.* Diet Composition Influences Growth Performance, Bioconversion of Black Soldier Fly Larvae: Agronomic Value and In Vitro Biofungicidal Activity of Derived *Frass*. **Agronomy**, v. 12, n. 8, p. 1765, 27 jul. 2022.

BARRAGAN-FONSECA, Karol B.; DICKE, Marcel; VAN LOON, Joop J. A. Influence of larval density and dietary nutrient concentration on performance, body protein, and fat contents of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*). **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 166, n. 9, p. 761–770, 1 set. 2018.

BEKKER, Nicolai Sundgaard *et al.* Impact of substrate moisture content on growth and metabolic performance of black soldier fly larvae. **Waste Management**, v. 127, p. 73–79, 15 maio 2021.

BOGDAN, Georgescu *et al.* A Comprehensive Method for the Evaluation of *Hermetia illucens* Egg Quality Parameters: Implications and Influence Factors. **Insects**, v. 13, n. 1, p. 17, 23 dez. 2021.

BOHM, Kristin *et al.* Black Soldier Fly-based bioconversion of biosolids creates high-value products with low heavy metal concentrations. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 180, 1 maio 2022.

BONELLI, Marco *et al.* Black Soldier Fly Larvae Adapt to Different Food Substrates through Morphological and Functional Responses of the Midgut. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 14, p. 4955, 13 jul. 2020.

BOSCH, G. *et al.* Standardisation of quantitative resource conversion studies with black soldier fly larvae. **Journal of Insects as Food and Feed**, v. 6, n. 2, p. 95–109, 8 abr. 2020.

BRASIL. Ofício Circular n° 33. MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento p. 6, 2023.

BRUNO, D. *et al.* Review: A journey into the black soldier fly digestive system: From current knowledge to applied perspectives. **animal**, p. 101483, mar. 2025.

CHAPAGAEE, Pawan *et al.* Valorisation of organic wastes through black soldier fly (*Hermetia illucens*) Larvae: Impacts on Growth, nutritional Composition, and bioconversion efficiency. **Waste Management Bulletin**, p. 100278, dez. 2025.

CHENG, Jack Y. K.; CHIU, Sam L. H.; LO, Irene M. C. Effects of moisture content of food waste on residue separation, larval growth and larval survival in black soldier fly bioconversion. **Waste Management**, v. 67, p. 315–323, 1 set. 2017.

DETMANN, E.; RODRIGUES, J. P. P.; DA SILVA, T. E.; BRITO NETO, A. de S.; FRANCO, M. de O. **Methods for feed analysis**. 3. ed. Viçosa, MG: Suprema Gráfica, 2025.

DZEPE, Daniel *et al.* Feeding strategies for small-scale rearing black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) as organic waste recycler. **SN Applied Sciences**, v. 3, n. 2, p. 252, 2 fev. 2021.

EGGINK, K. M.; DONOSO, I. G.; DALSGAARD, J. Optimal dietary protein to carbohydrate ratio for black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. **Journal of Insects as Food and Feed**, v. 9, n. 6, p. 789–798, 26 maio 2023.

EWALD, Nils *et al.* Fatty acid composition of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) – Possibilities and limitations for modification through diet. **Waste Management**, v. 102, p. 40–47, 1 fev. 2020.

FEDIAF. Nutritional guidelines for complete and complementary pet food for cats and dogs. Belgica: Bruxelas (2021)

FITRIANA, E. L.; LACONI, E. B.; JAYANEGARA, A. Influence of various organic wastes on growth performance and nutrient composition of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*): A meta-analysis. *In*: IOP Publishing Ltd, 28 jun. 2021.

FRANCIS, Aditya; SCHMITT, Eric; SMETANA, Sergiy. Making better Bugs: Improving black soldier fly production for a more sustainable future. **Journal of Cleaner Production**, v. 521, p. 146240, ago. 2025.

GABIATTI, Claudio *et al.* Characterization of dietary fiber from residual cellulose sausage casings using a combination of enzymatic treatment and high-speed homogenization. **Food Hydrocolloids**, v. 100, p. 105398, mar. 2020.

GESSERT, C. F.; PHILLIPS, P. H. Protein in the Nutrition of the Growing Dog. **The Journal of Nutrition**, v. 58, n. 3, p. 415–421, mar. 1956.

GHAFFARI, M. H.; DRACKLEY, J. K.; KERTZ, A. F. Invited review: Unlocking growth and development potential in dairy calves through precision protein feeding. **Journal of Dairy Science**, v. 108, n. 7, p. 6601–6616, jul. 2025.

GIANNETTI, Daniele *et al.* Do It by Yourself: Larval Locomotion in the Black Soldier Fly *Hermetia illucens*, with a Novel "Self-Harvesting" Method to Separate Prepupae. **Insects**, v. 13, n. 2, 1 fev. 2022.

GUILLAUME, J. B. *et al.* Amylase activity across black soldier fly larvae development and feeding substrates: insights on starch digestibility and external digestion. **Animal**, v. 18, n. 11, 1 nov. 2024.

HADJ SAADOUN, Jasmine *et al.* Lipid profile and growth of black soldier flies (*Hermetia illucens*, Stratiomyidae) reared on by-products from different food chains. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, n. 9, p. 3648–3657, 1 jul. 2020.

HOPKINS, Indee *et al.* The influence of food waste rearing substrates on black soldier fly larvae protein composition: A systematic review. **Insects.** MDPI AG, , 1 jul. 2021.

HOSSEINDOUST, Abdolreza *et al.* Quality Characteristics of Black Soldier Flies Produced by Different Substrates. **Insects**, v. 14, n. 6, 1 jun. 2023.

HUYLER, M. T.; KINCAID, R. L. The relationship between intestinally available protein and detergent insoluble protein of feedstuffs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 78, n. 1–2, p. 101–107, mar. 1999.

JASSO, Beatrice *et al.* Black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) *frass* and sheddings as a compost ingredient. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 7, 2023.

JESUS, Andressa Pereira de *et al.* Agronomic Efficiency of Compost Extracts and Nitrogen-Fixing Bacteria in Soybean Crops. **Microorganisms**, v. 13, n. 2, p. 341, 5 fev. 2025.

KLAMMSTEINER, Thomas *et al.* Larval density drives thermogenesis and affects microbiota and substrate properties in black soldier fly trials. **iScience**, v. 28, n. 7, 18 jul. 2025.

LALANDER, C. *et al.* Effects of feedstock on larval development and process efficiency in waste treatment with black soldier fly (*Hermetia illucens*). **Journal of Cleaner Production**, v. 208, p. 211–219, 20 jan. 2019.

LEE, Dong Jun *et al.* Tracking carbon and nitrogen flow in black soldier fly larvae cultivation: Effects of feed carbohydrate-to-protein ratio. **Journal of Environmental Management**, v. 397, 1 jan. 2026.

LEESON, S.; SUMMERS, J. D.; CASTON, L. J. Response of Broilers to Feed Restriction or Diet Dilution in the Finisher Period. **Poultry Science**, v. 71, n. 12, p. 2056–2064, dez. 1992.

LENI, Giulia; CALIGIANI, Augusta; SFORZA, Stefano. Killing method affects the browning and the quality of the protein fraction of Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) prepupae: a metabolomics and proteomic insight. **Food Research International**, v. 115, p. 116–125, 1 jan. 2019.

LIEVENS, Siebe *et al.* Ingestion and excretion dynamics of microplastics by black soldier fly larvae and correlation with mouth opening size. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, 1 dez. 2023.

MANI, Kannan *et al.* Effect of entomopathogenic fungus Beauveria bassiana on the growth characteristics and metabolism of black soldier fly larvae. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 197, p. 105684, dez. 2023.

MENEGUZ, Marco *et al.* Effect of rearing substrate on growth performance, waste reduction efficiency and chemical composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 15, p. 5776–5784, 1 dez. 2018.

MERTENS, D. R. Creating a System for Meeting the Fiber Requirements of Dairy Cows. Journal of Dairy Science, v. 80, n. 7, p. 1463–1481, jul. 1997.

NAKAMURA, Satoshi *et al.* Small-scale rearing of the black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae), in the laboratory: low-cost and year-round rearing. **Applied Entomology and Zoology**, v. 51, n. 1, p. 161–166, 12 fev. 2016.

NGUYEN, Trinh T. X.; TOMBERLIN, Jeffery K.; VANLAERHOVEN, Sherah. Influence of Resources on *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) Larval Development. **Journal of Medical Entomology**, v. 50, n. 4, p. 898–906, 1 jul. 2013.

NIU, Li *et al.* The effect of ball milling on the structure, physicochemical and functional properties of insoluble dietary fiber from three grain bran. **Food Research International**, v. 163, p. 112263, jan. 2023.

NRC. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. Estados Unidos: Washington (2021)

O'DONNELL, M. J.; DONINI, Andrew. Nitrogen Excretion and Metabolism in Insects. *In*: **Acid-Base Balance and Nitrogen Excretion in Invertebrates**. *[S.l.]*: Springer International Publishing, 2017. p. 109–126.

ODDON, Sara Bellezza; BIASATO, Ilaria; GASCO, Laura. Isoenergetic-practical and semi-purified diets for protein requirement determination in *Hermetia illucens* larvae: consequences on life history traits. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 13, n. 1, 1 dez. 2022.

OGELLO, Erick O. *et al.* Optimizing Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) production: effects of substrate variation on biomass, nutritional quality, hatchability, fecundity, and *frass* quality. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 9, 2025.

OJHA, Shikha; BUSSLER, Sara; SCHLÜTER, Oliver K. Food waste valorisation and circular economy concepts in insect production and processing. **Waste Management**, v. 118, p. 600–609, dez. 2020.

OVANI, Vagner S. *et al.* Use of internal markers to estimate feed intake and selection of forage in sheep fed grass and legume hay. **Animal Feed Science and Technology**, v. 283, p. 115177, jan. 2022.

PEGUERO, Daniela A. *et al.* Evaluation of ammonia pretreatment of four fibrous biowastes and its effect on black soldier fly larvae rearing performance. **Waste Management**, v. 160, p. 123–134, abr. 2023.

PLIANTIANGTAM, Nichaphon; CHUNDANG, Pipatpong; KOVITVADHI, Attawit. Growth performance, waste reduction efficiency and nutritional composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae and prepupae reared on coconut endosperm and soybean curd residue with or without supplementation. **Insects**, v. 12, n. 8, 1 ago. 2021.

PRADABPHETRAT, Piyaruk; SATHAWONG, Sidthipong; PIMSEN, Montakarn. Effects of Rearing Black Soldier Fly Larvae (*Hermetia illucens*) from Organic Wastes. **ASEAN Journal of Scientific and Technological Reports**, v. 27, n. 4, p. e252644, 30 jun. 2024.

QIN, Wenjie *et al.* Effects of biochar amendment on bioconversion of soybean dregs by black soldier fly. **Science of The Total Environment**, v. 829, p. 154605, jul. 2022.

SCHNEIDER, L. *et al.* Performance and nutrient composition of black soldier fly larvae fed diets with various protein concentrations throughout the life cycle. **Animal**, v. 19, n. 10, 1 out. 2025a.

SCHNEIDER, Laura *et al.* Dietary Protein Levels in Isoenergetic Diets Affect the Performance, Nutrient Utilization and Retention of Nitrogen and Amino Acids of *Hermetia illucens* (L.) (Diptera: Stratiomyidae) Larvae. **Insects** , v. 16, n. 3, 1 mar. 2025b.

SEYEDALMOOSAVI, Mohammad M. *et al.* Growth efficiency, intestinal biology, and nutrient utilization and requirements of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae compared to monogastric livestock species: a review. **Journal of Animal Science and Biotechnology**. BioMed Central Ltd, , 1 dez. 2022.

SHAO, Mingying *et al.* Synergistic bioconversion of organic waste by black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae and thermophilic cellulose-degrading bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, 10 jan. 2024.

SIDDIQUI, Shahida Anusha *et al.* Enhancing the bioconversion rate and end products of black soldier fly (BSF) treatment – A comprehensive review. **Environment, Development and Sustainability** Springer Science and Business Media B.V., 1 maio 2025.

SNIFFEN, C. J. *et al.* A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 11, p. 3562–3577, 1 nov. 1992.

SPRANGHERS, Thomas *et al.* Nutritional composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) prepupae reared on different organic waste substrates. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 8, p. 2594–2600, 1 jun. 2017.

UJVARI, Beata *et al.* Experimental studies of blowfly (Calliphora stygia) longevity: A little dietary fat is beneficial but too much is detrimental. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 154, n. 3, p. 383–388, nov. 2009.

WANG, Yu *et al.* Relationship of black soldier fly larvae (BSFL) gut microbiota and bioconversion efficiency with properties of substrates. **Waste Management**, v. 180, p. 106–114, maio 2024.

YAKTI, Wael *et al.* Physical Properties of Substrates as a Driver for *Hermetia illucens* (L.) (Diptera: Stratiomyidae) Larvae Growth. **Insects**, v. 14, n. 3, 1 mar. 2023.

YILDIRIM-AKSOY, Mediha; ELJACK, Rashida; BECK, Benjamin H. Nutritional value of *frass* from black soldier fly larvae, *Hermetia illucens*, in a channel catfish, Ictalurus punctatus, diet. **Aquaculture Nutrition**, v. 26, n. 3, p. 812–819, 30 jun. 2020.

ZHANG, Qi Hui; PUNIAMOORTHY, Nalini. Impact of Rearing Substrates on Black Soldier Fly Growth and Fertility: A Semi-Industrial Scale Study to Optimize Egg Collection. **Insects** , v. 16, n. 2, 1 fev. 2025.

ZHAO, Shanshan *et al.* Synergistic reshaping of nitrogen flow by black soldier fly and gut ammonia-assimilating bacteria: Green transformation from nitrogenous waste to insect protein. **Environmental Technology and Innovation**, v. 40, 1 nov. 2025.

CAPÍTULO III

4 CAPÍTULO III – Alterações enzimáticas no trato digestivo de larvas de *Hermetia illucens* produzidas em dietas com diferentes teores proteicos

RESUMO

A larva da mosca soldado negro (LMSN) apresenta elevada plasticidade de secreção enzimática proteolítica no seu trato digestivo, adaptando-se ao substrato em que ela se encontra. O presente estudo teve como objetivo determinar a influência dos diferentes teores de proteína bruta (PB%) dietética em dietas a base de resíduos orgânicos pré-consumo humano (RPCH) na atividade enzimática do trato digestivo de LMSN. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial triplo 5x4x3 (n=6). O primeiro fator foi o teor de %PB: PB22%, PB19%, PB15%, PB13% e PB6%. O segundo fator foi o tempo, em dias de ciclo de crescimento, na fase de cria, com abates realizados: D7, D8, D9 e D10. E o terceiro fator foram os pH's de incubação dos géis: 3, 7 e 11. As dietas foram compostas por resíduos orgânicos (RPCH), amido de milho e fibra de coco. Os ingredientes foram misturados causando o efeito de diluição proteica e a umidade foi ajustada para 84%. Utilizaram-se caixas com 297 cm^2 contendo 0,2g de ovos e 717g de dieta úmida/repetição. No D7, D8, D9 e D10, realizou-se separação manual das larvas e *frass*. Larvas vivas foram separadas para coleta dos intestinos. O total de 9 indivíduos/tratamento em cada dia de abate foram utilizados para compor um homogenato armazenado em tubos *eppendorf*. A atividade enzimática foi determinada por eletroforese em gel de poliacrilamida (8%) copolimerizado com gelatina. A corrida foi realizada a 4º C, com 100V por 2 horas. Em seguida o gel foi lavado, incubado e, posteriormente, corado com coomasie blue R-250 (0,5%) e descolorado em solução de 5% metanol + 7,5% ácido acético por 6 horas. Após, foram registradas imagens dos géis através do Gel Doc XR + Gel Documentation System (BioRad). As imagens foram processadas pelo software Image Lab v. 6.0.1 (BioRad) e a densidade das bandas normalizada pela quantidade de proteína aplicadas no poço, fornecendo o parâmetro unidade de atividade enzimática arbitrária (UA). Esse valor foi relativizado pelo total de atividade enzimática de cada tratamento, promovendo a UA%. Foram identificadas 6 bandas através da zimografia. Houve superior atividade enzimática em todos os dias na banda 1. Entretanto, com tendência a redução da expressão deste grupo de enzimas conforme o aumento do teor de PB% dietético. A banda 2 apresentou maiores atividades no dia 7 e 10, principalmente no teor de 6% PB. A banda 4 por sua vez, apresentou comportamento oposto à banda 1, apresentando maior atividade em teores mais elevados de PB%, em todos os dias observados. A redução da atividade enzimática da banda 1, está associada à inibição que associado ao aumento do teor de PB% ou à ativação pela escassez de PB% dietética. Já na banda 2, há elevada atividade proteica na dieta de 6% PB, que está associada a maior expressão de proteases, a fim de ter maior aproveitamento da proteína presente na dieta. Conclui-se que os diferentes teores proteicos dietéticos em dietas a base de RPCH, alteram a atividade enzimática do trato digestivo de larvas de *H. illucens* em fase de "cria". Em que a dieta de 19% PB apresentou maior atividade proteolítica, tendo maior aproveitamento da proteína dietética

Palavras-chave: *Black Soldier Fly*, Enzima Digestiva, Trato digestivo.

ABSTRACT

Black soldier fly larvae (BSFL) exhibit high plasticity in proteolytic enzyme secretion within their digestive tract, allowing them to adapt to the substrate on which they are reared. This study aimed to determine the influence of different dietary crude protein levels (%CP) in diets based on pre-consumer human organic residues (PCHOR) on the enzymatic activity of the BSFL digestive tract. A completely randomized design in a triple factorial arrangement (5 × 4 × 3; n = 6) was used. The first factor was dietary crude protein level (%CP): CP22%, CP19%, CP15%, CP13%, and CP6%. The second factor was time, expressed as days of the growth cycle during the starter phase, with sampling on days D7, D8, D9, and D10. The third factor was the pH of gel incubation: 3, 7, and 11. Diets were composed of PCHOR, corn starch, and coconut fiber. The ingredients were mixed to promote protein dilution, and moisture was adjusted to 84%. Containers measuring 297 cm² were used, each containing 0.2 g of eggs and 717 g of wet diet per replicate. On days D7, D8, D9, and D10, larvae and *frass* were manually separated. Live larvae were selected for intestinal collection. A total of 9 individuals per treatment on each sampling day were pooled to prepare a homogenate, which was stored in Eppendorf tubes. Enzymatic activity was determined by polyacrylamide gel electrophoresis (8%) copolymerized with gelatin. The run was performed at 4°C and 100 V for 2 hours. The gel was then washed, incubated, and stained with 0.5% Coomassie Blue R-250, followed by destaining in a solution of 5% methanol and 7.5% acetic acid for 6 hours. Gel images were captured using a Gel Doc XR+ Gel Documentation System (Bio-Rad). The images were processed using Image Lab v. 6.0.1 (Bio-Rad), and band density was normalized to the amount of protein applied into the wells, yielding the parameter, arbitrary enzymatic activity units (UA). Which was relativized by the total enzymatic activity of each treatment, promoting the UA%. A 6-band pattern was identified in the zymography. Higher enzymatic activity was observed in band 1 on all sampling days; however, a trend toward reduced expression of this enzyme group was noted as dietary %CP increased. Band 2 showed higher activity on days 7 and 10, particularly at the 6% CP level. In contrast, band 4 exhibited the opposite pattern to band 1, showing greater activity at higher %CP levels across all observed days. The reduction in enzymatic activity in band 1 is associated with inhibition linked to increased dietary %CP or activation under dietary %CP scarcity. In band 2, the high proteolytic activity at the 6% CP diet is associated with increased protease expression to enhance utilization of the limited protein available in the diet. It is concluded that different dietary protein levels in diets based on pre-consumer human organic residues alter the proteolytic activity of the digestive tract of *H. illucens* larvae during the starter phase, with the 19% CP diet exhibiting the highest overall proteolytic activity, making better use of dietary protein.

Keywords**:** Black Soldier Fly, Digestive Enzyme, Digestive Tract.

4.1 INTRODUÇÃO

A larva da mosca soldado negro (LMSN) é um inseto saprófago, generalista quanto as fontes alimentares que suprem suas necessidades nutricionais. Em condições naturais, alimentam-se de fontes vegetais em geral: frutas, verduras, legumes a carcaças de animais (Bruno et al., 2025) em decomposição. Entretanto, em sistemas intensivos de produção podem se desenvolver em dietas formuladas a base de grãos (Meneguz et al., 2018). Destacando-se a habilidade que o inseto possui quanto a plasticidade adaptativa enzimática ao substrato alimentar disponível (Zhang; Yang; Rehman, 2024). Tornando esta espécie de inseto, um animal com apelo ecológico no controle de resíduos, pois é possível alimentá-lo com resíduo pré-consumo humano (RPCH) (BRASIL, 2023), dentre outros tipos de descartes da indústria de alimentos (Pradabphetrat; Sathawong; Pimsen, 2024).

A produção de LMSN em condições industriais baseia-se na utilização de duas alimentações. Na fase de "cria" utiliza-se um tipo de substrato alimentar e outro para a fase de "recria" (Ogello et al., 2025). Sugere-se que as larvas em fase de "cria" necessitam de maior aporte proteico dietético, muito embora a exigência não tenha sido especificamente definida (Schneider et al., 2025a, 2025b). Associada a superior exigência nutricional desta fase e a necessidade de separação física da larva de menor tamanho do frass. O manejo de fornecimento de alimentação específica para a fase de cria, distinta daquela da engorda pode gerar impactos. A substituição do substrato alimentar promove sobre a necessidade da readaptação enzimática ao novo alimento, causando um período transicional, que haverá redução no aproveitamento do novo substrato (Bonelli et al., 2020; Bruno et al., 2019a, 2019b).

A atividade proteolítica da LMSN ainda é pouco estudada. Os estudos concentram-se na ordem dos dípteros, entretanto, não exatamente com LMSN (Giglioti et al., 2016), que apresentam as enzimas serina-proteases e proteases do tipo tripsina (Pinilla et al., 2013). Sendo as maiores atividades observadas em pH neutro 7 para alcalino 10 (Cuervo et al., 2008; Fazito do Vale; Pereira; Gontijo, 2007).

A capacidade de produção enzimática da LMSN é modulada pelas propriedades físico-químicas do substrato alimentar, como o pH e os teores nutricionais dietéticos (Wakuda *et al*., 2024). Estudos indicam que a quantidade e o tipo de proteína que compõem a dieta são elementos moduladores (Bonelli et al., 2020). Substratos com baixo teor proteico ocasionam maior expressão proteolítica em animais, permitindo melhor aproveitamento da proteína escassa na dieta (Lu et al., 2021). Entretanto, os teores adequados de proteína bruta estão entre 15 e 19% (Schneider et al., 2025a, 2025b) na criação de LMSN. Contudo, são poucos os estudos que abordam a capacidade de digestão do substrato proteico pela larva, nas suas diferentes fases de consumo ativo (Zhang; Puniamoorthy, 2025).

A variabilidade sazonal e as distintas origens botânicas dos ingredientes vegetais que compõem o RPCH podem alterar os teores de proteína desta fonte. Adicionalmente, uma parte dos alimentos descartados não sofrem pré-tratamento térmico, assim como alguns grãos e legumes, consequentemente, podem impactar sobre a expressão da atividade enzimática da LMSN. Alguns vegetais apresentam como meio de defesa inibidores de Bowman-Birk e Kunitz, responsáveis por reduzir a atividade proteolítica do trato digestivo de insetos (Bonturi et al., 2022; Kårlund et al., 2021). Embora o RPCH apresente limitações de ordem sazonal que afetam a composição nutricional, bem como a possibilidade de inibidores enzimáticos, a sua utilização de forma consciente, através de coletas seletivas, promove apelo ecológico à produção (Broeckx et al., 2021).

A utilização de uma única dieta no ciclo produtivo, tende a melhorar os índices produtivos, visto que o ciclo de vida da LMSN é curto e, o período de atividade de consumo ativo de alimento, restringe-se a fase larval (Bruno et al., 2025). Alterações no manejo alimentar, assim como a troca da dieta, podem gerar atrasos e mudanças nos indicadores de produção em sistemas intensivos.

O presente estudo tem como objetivo determinar como os teores crescentes de proteína dietética em substratos contendo RPCH afetam a atividade enzimática proteolítica do trato digestivo da larva de *Hermetia illucens*

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Local

A pesquisa foi realizada no laboratório de nutrição animal do departamento de nutrição animal e pastagens do Instituto de Zootecnia da UFRRJ. O projeto foi comunicado a CEUA/IZ/ UFRRJ, nº 0234-02-2025.

Colônia utilizada de LMSN

Utilizaram-se ovos de larvas da espécie *Hermetia illucens* (Insecta: Diptera, Stratomyidae) produzidas pela empresa Let's Fly, CNPJ – 2.041.946/0001-46, sediada em Cachoeiras de Macacu, RJ. Com colônia original adquirida da empresa *Cyns* (Piracicaba, SP, Brasil).

Delineamento Experimental

Utilizou-se delineamento experimental inteiramente casualizado em arranjo fatorial triplo 5x4x3 (n=6). O primeiro fator foi o teor de proteína dietética (%PB): PB22%, PB19%, PB15%, PB13% e PB6%. O segundo fator foi o tempo em dias de ciclo de crescimento para ocorrer o abate: D7, D8, D9 e D10. O terceiro fator foi representado pelos diferentes pH's que os géis foram incubados: 3, 7 e 11. Cada repetição foi representada por uma ao menos um trato digestivo larval de cada caixa de criação.

Formulação das dietas

As dietas foram formuladas com os ingredientes: resíduo orgânico pré-consumo humano (RPCH), amido de milho e fibra de coco (Tabela 1). A empresa Videverde Compostagem realizou a coleta seletiva do RPCH provenientes de cozinhas industriais e supermercados. O material foi transportado em recipientes de 50L e passou por processo de classificação dos fornecedores para identificação de plásticos e material impróprio. Fornecedores de RPCH que descartavam material orgânico impróprio para a alimentação de insetos (Brasil, 2023), foram eliminados do estudo. Os resíduos aptos passaram por triagem final, espalhando-se o conteúdo em instalação apropriada para a identificação/separação de possíveis fontes plásticas. Em seguida, as frutas, legumes, vegetais e outros tipos de RPCH foram moídos para criar um "blend" e armazenados para posterior utilização como substrato nutricional. O material foi encaminhado para a UFRRJ para início do experimento.

Tabela 1. Composição dos ingredientes utilizados na formulação das dietas na matéria seca

Nutrientes (%)	Fibra de coco	Amido de milho	RPCH[1]
Matéria Seca total	89,6	88,1	15,7
Matéria Mineral	10,3	<0,01	6,0
Proteína Bruta	2,4	0,7	22
Extrato Etéreo	0,1	0,4	14,5
Fibra bruta	22,1	0,3	10,4
Fibra em Detergente Neutro	58,4	0,3	20,5
Fibra em Detergente Ácido	55,1	<0,01	18,3
Hemicelulose	3,3	0,3	2,2
ENN[2]	65,1	98,6	47,4
CNF[3]	28,7	98,6	37,4
Energia Bruta (Kcal/Kg)	3695	4216	5293

RPCH[1]: resíduo orgânico pré-consumo humano; Extrativo Não Nitrogenado (ENN)[2] = 100 – (PB+FB+EE+MM); Carboidratos Não Fibrosos (CNF)[3] = 100 – (MM+PB+EE+FDN)

O RPCH úmido foi analisado imediatamente para a formulação das dietas. O RPCH úmido puro compôs a dieta 22%PB. Nas demais formulações, foram incluídos os ingredientes para causar o efeito diluidor. As dietas (Tabela 2) foram formuladas a fim de reduzir os teores proteicos dietéticos, através da inclusão da fibra de coco e do amido (50:50).

Tabela 2. Composição bromatológica das dietas experimentais na matéria seca

Nutrientes (%)	Teor de proteína bruta dietético (%)				
	22%	19%	15%	13%	6%
Matéria Seca total	15,7	16,1	16,1	16,9	18,1
Matéria Mineral	6,0	6,6	7,1	7,5	7,8
Proteína Bruta	22	19,0	15,4	13,4	6,0
Extrato Etéreo	14,5	12,8	9,4	7,4	2,6
Fibra em Detergente Neutro	20,5	22,0	25,0	28,2	34,7
Fibra em Detergente Ácido	18,3	19,8	24,1	28,0	31,6
Hemicelulose	2,22	2,22	0,92	0,17	3,12
CNF[1]	37,4	39,6	43,1	43,5	48,9
Energia Bruta (Kcal/Kg)	5293	5159	4950	4741	4323
NIDN[2]	0,35	0,30	0,30	0,30	0,31
PIDN[3]	2,2	1,9	1,9	1,8	2,0

Carboidratos Não Fibrosos (CNF)[1] = 100 – (MM+PB+EE+FDN); Nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN)[2], Proteína insolúvel em detergente neutro (PIDN)[3] (Mertens, 1997).

Realizou-se a homogeneização dos ingredientes de cada dieta experimental manualmente (Tabelas 3). Para o ajuste adequado de umidade entre as dietas, realizou-se o balanço de massas (Equação 1) a fim de ajustar a umidade final para 83%.

Equação (1)

$$Maad = \frac{Mgo * \omega ao - \omega af}{1 - \omega af}$$

M_{aad} = Massa de água adicionada ao substrato para atingir a umidade desejada

M_{go} = Massa do alimento úmido inicial (Kg)

ω_{ao} = Fração mássica inicial de água, representando a umidade presente no alimento úmido, dividida por 100

ω_{af} = Fração mássica final de água, representando a umidade que se deseja atingir no alimento úmido, dividida por 100

Tabela 3. Inclusão de ingredientes (%) na matéria seca e natural em cada dieta

Ingrediente (%)	Dietas									
	PB22%		PB19%		PB16%		PB13%		PB6%	
	MN	MS	MN	MS	MN	MS	MN	MS	MN	MS
RPCH	100	100	90	90	74,4	74,4	58,8	58,8	27,5	27,5
Fibra de coco	0	0	1,19	5	3,04	12,8	4,9	20,6	8,62	36,25
Amido de milho	0	0	1,17	5	2,99	12,8	4,81	20,6	8,46	36,25
Água	0	0	7,64	0	19,57	0	31,49	0	55,42	0
Total (%)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

MS: Matéria seca; MN: Matéria Natural

Ensaio de criação das LMSN

Foram utilizadas caixas plásticas com dimensões de (19,6x15,1x8,8cm) com o total de 297 cm^2 e volume de 2605 cm^3. Em cada caixa foram adicionados 0,2g de ovos e 717g de dieta úmida/tratamento. Utilizaram-se ovos com até 24 horas de postura, para que não houvesse diferença de tempo de eclosão. A contagem do tempo de idade das larvas iniciou-se no dia de montagem do experimento como instante 0. Um suporte plástico recebeu os ovos e foi posto sobre o substrato, evitando o contato direto com a umidade. As caixas foram identificadas e acondicionadas de forma aleatória em sala protegida de invasores, com temperatura e umidade média de 28ºC e 69%.

Utilizou-se ventilação direta sobre as caixas a partir do 4º dia, com o objetivo de controle de umidade ambiente e prevenção de fuga. Nos dias de abate, procedeu-se a separação mecânica através de peneiras e da coleta manual das larvas. Após, separaram-se amostras de larvas vivas para a dissecação.

Dissecação de intestinos

Foram coletadas 9 larvas de peso padronizado de cada tratamento e dia de abate. As larvas coletadas foram "adormecidas" em congelador, por 2 minutos (Leni et al., 2019) e, em seguida, realizou-se a dissecação em solução NaCl 0,15M, com o auxílio de um microscópio digital (Andonstar AD246SM), pinças e micro tesouras. Realizou-se um corte na região cefálica e região do ânus, para que não houvesse rompimento do intestino, após, puxou-se a cabeça a fim de tracionar completamente o trato gastrointestinal. Os intestinos foram armazenados em tubos *eppendorf* para posterior análises de atividade proteolítica.

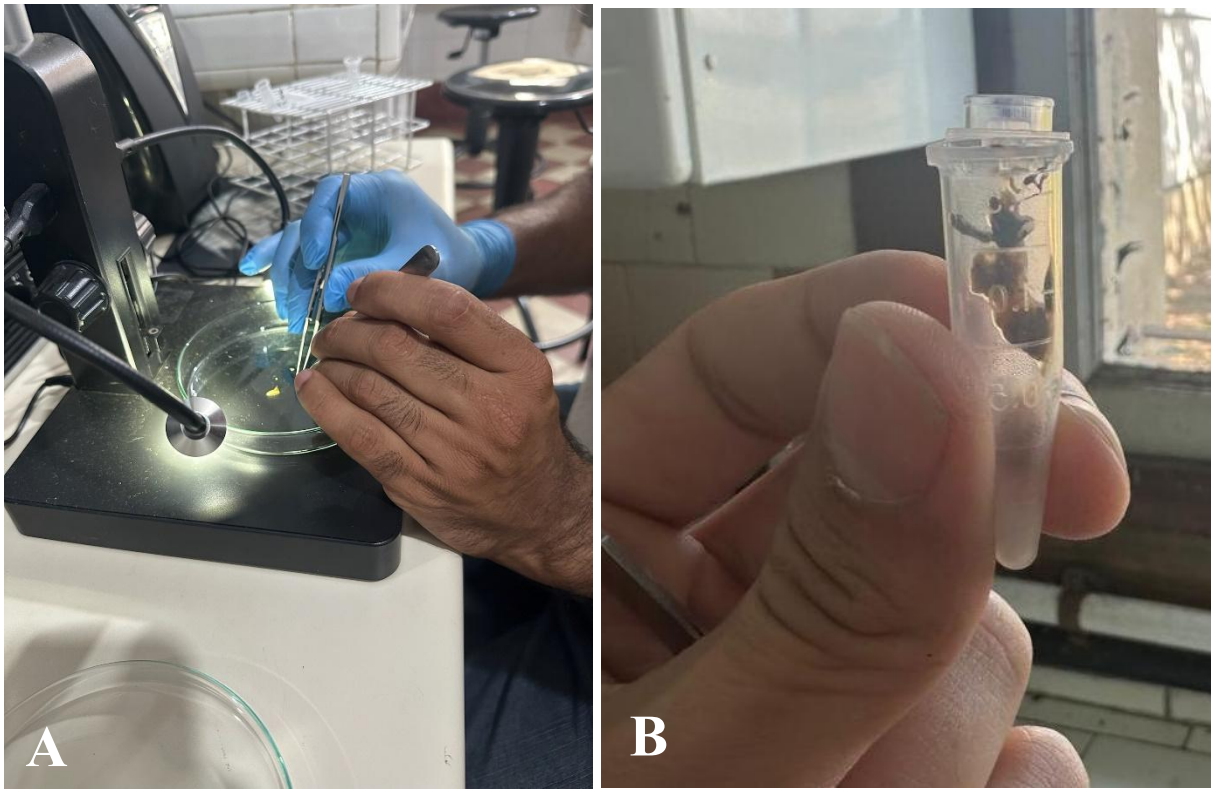


Figura 1. A: Dissecação de intestino de larva de *Hermetia illucens* abatida. B: Intestino de larva de *Hermetia illucens* armazenado em tubo *eppendorf*

Determinação de atividade proteolítica – Eletroforese e zimograma

Foram utilizados o trato digestivo de 9 indivíduos de 7, 8, 9 e 10 dias de ciclo, por tratamento. Em seguida, preparou-se um homogenato com os tratos digestivos, adicionando-se 0,5 mL de água destilada por tratamento e por abate. A quantidade de proteínas foi determinada pelo método de Lowry (Lowry *et al*., 1951) com curva padrão de albumina. A atividade proteolítica foi determinada através de ensaios de eletroforese e zimograma em diferentes pH: 3, 7 e 11.

Foram utilizados géis de poliacrilamida (8%), para realização da "corrida" da eletroforese, que foram copolimerizados com 0,1% gelatina e 0,1% SDS. Géis de 12%, provocaram retenção das proteases. Confeccionou-se gel de empilhamento (4%) para formação dos poços de aplicação de amostra. Em seguida, foram aplicados 5 µg de proteína de amostra nos poços. Para evitar a desnaturação completa das proteínas, as amostras não foram fervidas antes da aplicação e β-Mercaptoethanol não foi adicionado ao tampão de amostra. Amostras controle compostas apenas por tampão foram aplicados.

A corrida foi realizada à 4°C, com 100 V por 2 h, utilizando tampão Tris-glicina (pH 8,8) como condutor no equipamento Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell (Bio-Rad). Após a corrida, os géis foram incubados em Tampão Tris-HCl 0,1 M + Triton X-100 1% (v/v) por 30 minutos sob agitação. Esse processo foi repetido para completa remoção do SDS e renaturação das proteínas. Após a lavagem, os géis foram transferidos para o tampão Tris-HCl 0,1 M + $CaCl_2$ 0,0025 M + NaCl 0,15 M e incubados em banho-maria a 37°C por 2 horas. Tanto a lavagem, quanto a incubação, foram realizadas em tampões em diferentes pH específicos, sendo eles 3, 7 e 11.

Após a incubação, os géis foram corados com Coomassie Blue R-250 (0,5%) sob agitação por 16 horas e descorados em solução de 5% metanol + 7,5% ácido acético por 6 horas. Após a descoração, as imagens dos géis foram capturadas e armazenadas pelo Gel Doc XR+ Gel Documentation System (BioRad).

O aparecimento de bandas indicou a posição das proteases capazes de degradar a gelatina presente no gel e, a intensidade fornecida pela densitometria das bandas aferiu a atividade das proteases.

A utilização de diferentes pH's na incubação auxilia na identificação da enzima proteolítica encontrada em cada banda, visto que há proteases que são inibidas ou ativadas em diferentes pH's (Fazito do Vale et al., 2007). E para os dípteros, estudos demonstram que as proteases mais abundantes são as serina proteases e as do tipo tripsina, que são afetadas diretamente pelo pH, sendo inibidas por pH ácido e atuando mais próximo do pH 7-8 (Pinilla et al., 2013). Desta forma, optou-se pelo estudo do pH 7, uma vez que é o pH que tem maior atividade enzimática e possibilidade de determinação do grupo de proteases, realizando a incubações em outros pH's a fim de realizar um estudo exploratório.

As imagens geradas foram processadas pelo software Image Lab v. 6.0.1 (Bio-Rad). A densidade das bandas (em pixel) fornecida pelo programa foi normalizada pela quantidade de proteínas depositadas nos poços (5 µg), fornecendo o parâmetro Unidade de Atividade Enzimática arbitrária (UA), sendo a densidade de bandas/µg de proteína. Em seguida, realizou-se a soma de todas as bandas de cada tratamento e relativizou-se o valor de cada banda a partir do total de UA observada, resultando na atividade enzimática arbitrária relativizada (UA%).

Análise Estatística

As informações colhidas das imagens da eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% foram avaliadas por meio de análise qualitativa, convertendo-se os pixels das bandas em unidades arbitrárias percentuais (UA%). Para cada dia do ciclo, foram geradas imagens contemplando todos os tratamentos, incubados nos pH's 3, 7 e 11. Optou-se por análise qualitativa visto que não houve repetições suficientes para análise estatística, devido a necessidade de elaboração do homogenato dos tratos digestivos.

4.3 RESULTADOS

Observaram-se em todos os teores de proteína bruta seis bandas que caracterizaram a presença de proteases distintas no trato digestivo das LMSN. Para cada dia de ciclo, foram realizadas imagens nos pH's 3, 7 e 11.

Somente os géis referentes ao D7 serão abordados, uma vez que após o sétimo dia de ciclo, houve subnutrição larval, afetando desta forma a expressão proteolítica. Os géis referentes aos dias 8, 9 e 10 estão apresentados para fins de comprovação do efeito de restrição nutricional, como um estudo exploratório.

Para todos os géis realizados, observou-se uma banda superior muito expressiva. Tal banda está associada à atividade enzimática do próprio substrato nutricional, principalmente atrelada ao RPCH, que possuía atividade microbiana devido ao processo fermentativo.

As figuras 3, 4 e 5 representam os géis referentes ao D7 em diferentes pHs.

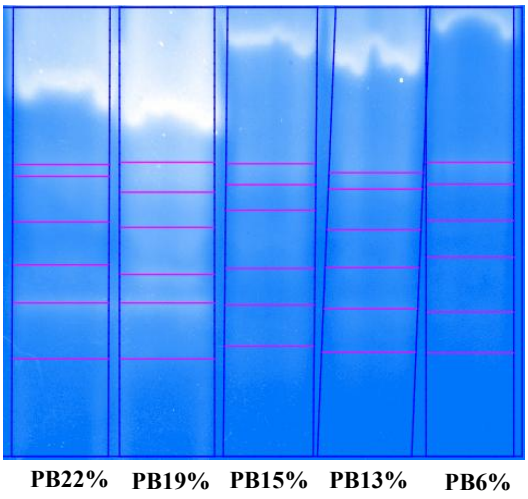


Figura 3: Atividade proteolítica do trato digestivo de larvas alimentadas com dietas contendo teores crescentes de proteína bruta no D7 em pH 3.

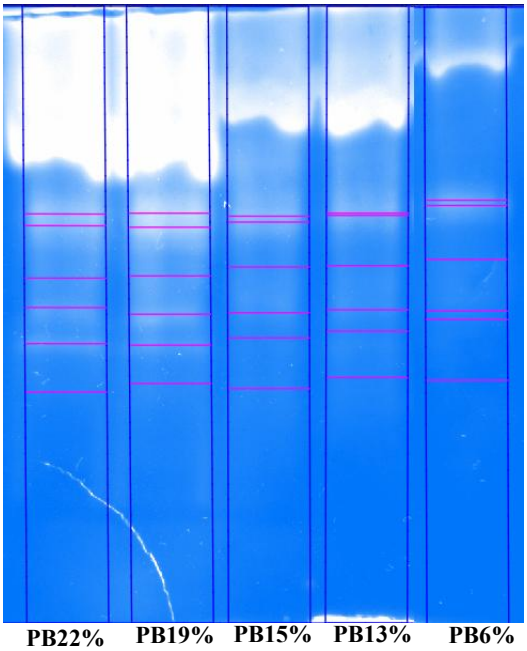


Figura 4: Atividade proteolítica do trato digestivo de larvas alimentadas com dietas contendo teores crescentes de proteína bruta no D7 em pH 7.

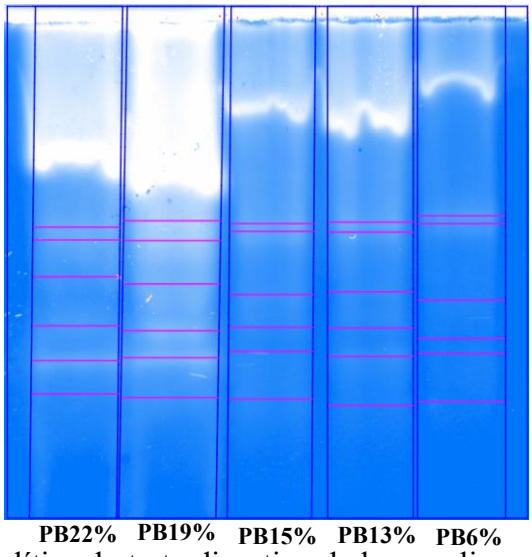


Figura 5: Atividade proteolítica do trato digestivo de larvas alimentadas com dietas contendo teores crescentes de proteína bruta no D7 em pH 11.

Todos os géis referentes ao D7 apresentam maior atividade enzimática no tratamento de 19% PB. Suas bandas 1 e 2 são mais expressivas. E em pH 7, para todos os tratamentos, ocorre aumento da atividade enzimática quando comparado com os outros pH's analisados.

A seguir, as figuras 6, 7 e 8 representam os géis referentes a atividade enzimática do trato digestivo da LMSN do oitavo dia de crescimento larval em diferentes pHs.

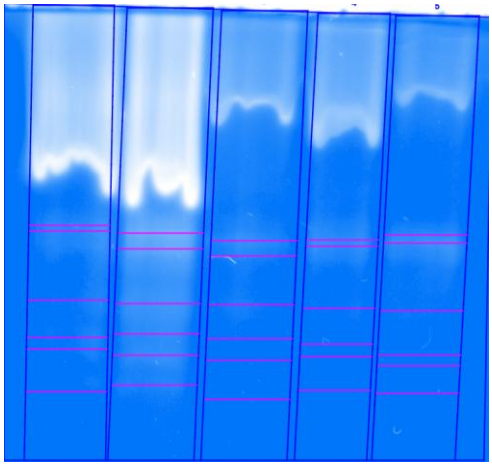


Figura 6: Atividade proteolítica do trato digestivo de larvas alimentadas com dietas contendo teores crescentes de proteína bruta no D8 em pH 3.

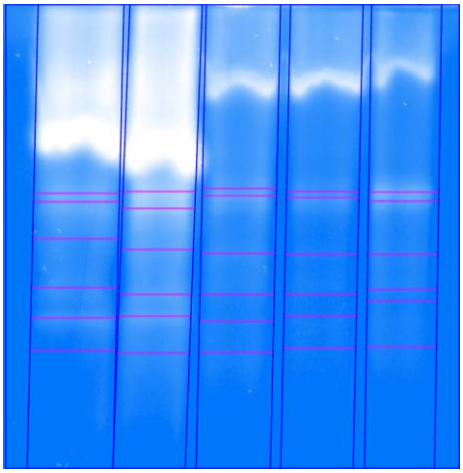


Figura 7: Atividade proteolítica do trato digestivo de larvas alimentadas com dietas contendo teores crescentes de proteína bruta no D8 em pH 7.

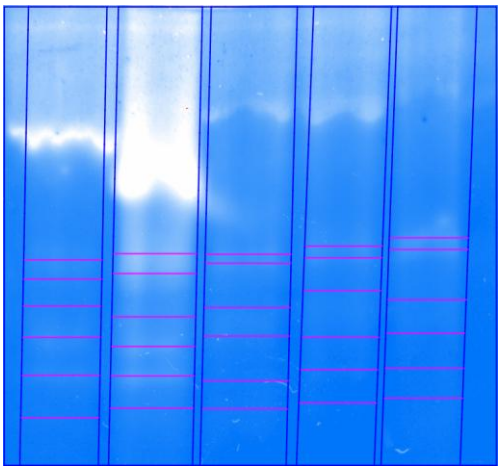


Figura 8: Atividade proteolítica do trato digestivo de larvas alimentadas com dietas contendo teores crescentes de proteína bruta no D8 em pH 11.

Assim como ocorreu no D7, a atividade enzimática referente ao oitavo dia de ciclo de criação apresentou maior atividade na dieta de 19% PB. Novamente as bandas 1 e 2 foram as mais expressivas. Quanto ao pH aplicado no gel, observou-se que o pH 7 foi mais expressivo no aumento da atividade enzimática para as dietas 22%, 19% e 15% de PB, quando comparado aos demais pHs analisados. Entretanto, nas dietas com 13 e 6% de PB, observou-se maior atividade enzimática em pH 11.

A seguir, as figuras 9, 10 e 11 representam os géis referentes a atividade enzimática do trato digestivo da LMSN do nono dia de crescimento larval em diferentes pHs.

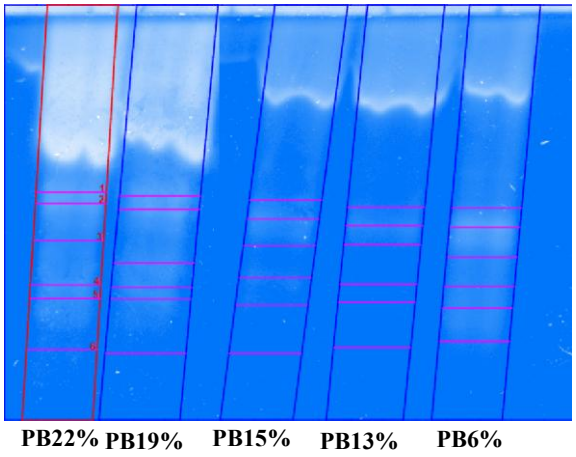


Figura 9: Atividade proteolítica do trato digestivo de larvas alimentadas com dietas contendo teores crescentes de proteína bruta no D9 em pH 3.

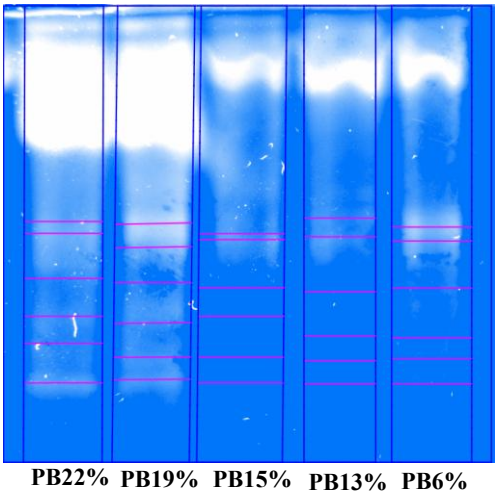


Figura 10: Atividade proteolítica do trato digestivo de larvas alimentadas com dietas contendo teores crescentes de proteína bruta no D9 em pH 7.

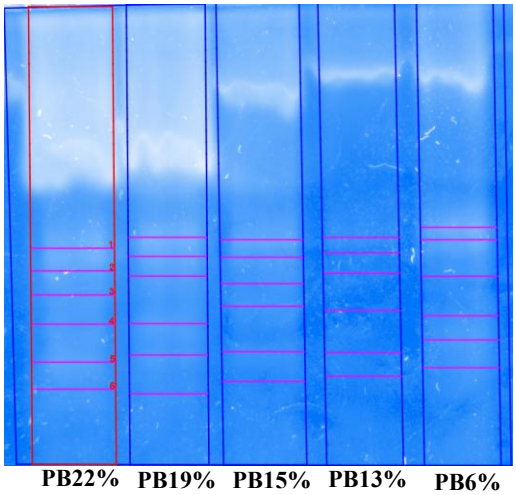


Figura 11: Atividade proteolítica do trato digestivo de larvas alimentadas com dietas contendo teores crescentes de proteína bruta no D9 em pH 11.

Assim como nos outros dias de ciclo, a atividade enzimática referente ao nono dia de criação apresentou maior expressão na dieta de 19% PB. Em pH 3, todas as dietas exibiram menores atividades proteolíticas. Em pH 7, houve maior atividade proteolítica para as dietas com 19%, 15% e 13% PB. Por sua vez, em pH 11, verificou-se aumento da atividade proteolítica nas dietas com 22% e 6% de PB.

A seguir, as figuras 12, 13 e 14 representam os géis referentes a atividade enzimática do trato digestivo da LMSN do décimo dia de crescimento larval em diferentes pHs.

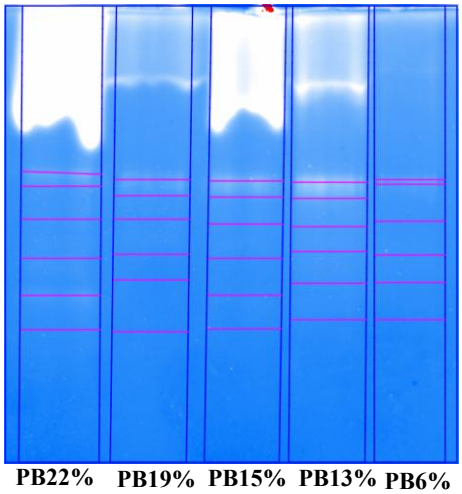


Figura 12: Atividade proteolítica do trato digestivo de larvas alimentadas com dietas contendo teores crescentes de proteína bruta no D10 em pH 3.

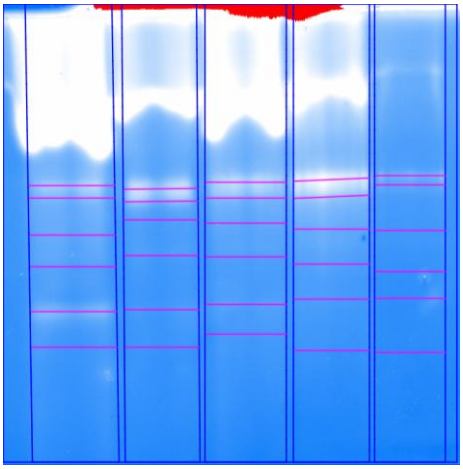


Figura 13: Atividade proteolítica do trato digestivo de larvas alimentadas com dietas contendo teores crescentes de proteína bruta no D10 em pH 7.

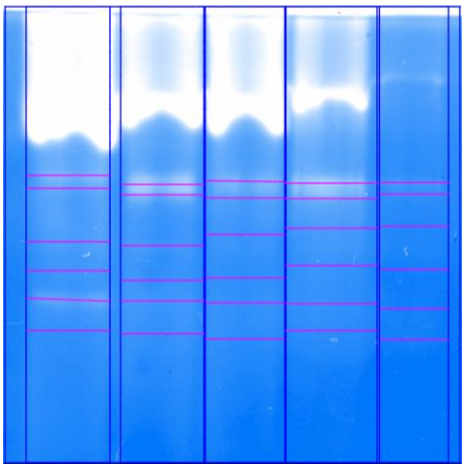


Figura 14: Atividade proteolítica do trato digestivo de larvas alimentadas com dietas contendo teores crescentes de proteína bruta no D10 em pH 11.

Em contraste com os demais dias analisados, no décimo dia de ciclo as maiores atividades proteolíticas foram observadas nas dietas contendo 13% e 22% de PB, nas dietas incubadas em pH 7, sendo a maior expressão observada na dieta de 13% PB. Em pH 3, todas as dietas, com exceção daquelas com 6% PB, tiveram menores atividades proteolíticas. Por sua vez, em pH 11, a dieta com 19% PB apresentou maior atividade proteolítica.

As atividades enzimáticas foram expressas em Atividade enzimáticas arbitrária relativas (UA%) (Tabelas 4, 5 e 6).

Tabela 4: Atividade enzimática arbitrária relativa (UA%) em pH 3 das bandas, do trato digestivo de larva de *H. illucens* alimentadas em teores crescentes de proteína bruta, em cada dia de ciclo.

Tratamentos e Dias	Bandas					
	1	2	3	4	5	6
Dia 7 em pH 3						
22% PB	36,62	14,97	11,59	8,48	23,51	4,83
19% PB	35,81	15,26	18,59	13,80	13,14	3,39
15% PB	54,88	16,72	10,06	7,28	8,82	2,24
13% PB	23,02	18,07	17,57	14,11	21,41	5,82
6% PB	47,31	17,15	5,17	4,96	21,28	4,13
Dia 8 em pH 3						
22% PB	19,59	24,14	10,90	21,10	21,93	2,34
19% PB	30,12	25,46	22,32	5,28	14,76	2,06
15% PB	33,00	8,70	28,74	11,94	8,91	8,70
13% PB	37,42	29,18	18,26	8,91	3,34	2,90
6% PB	20,56	51,01	12,10	8,67	3,83	3,83
Dia 9 em pH 3						
22% PB	24,87	25,13	3,13	22,01	22,66	2,21
19% PB	27,85	25,46	16,71	13,13	9,28	7,56
15% PB	26,58	24,11	4,93	22,47	13,42	8,49
13% PB	16,95	64,64	4,81	4,81	5,02	3,77
6% PB	15,96	26,53	10,02	22,45	19,85	5,19
Dia 10 em pH 3						
22% PB	24,88	7,26	12,16	20,73	25,09	9,88
19% PB	39,42	10,82	10,58	20,43	15,02	3,73
15% PB	42,37	18,59	10,45	11,19	14,71	2,68
13% PB	50,22	11,05	3,73	15,74	13,03	6,22
6% PB	27,42	27,79	6,76	16,45	12,61	8,96

Tabela 5: Atividade enzimática arbitrária relativa (U%) em pH 7 das bandas, do trato digestivo de larva de *H. illucens* alimentadas em teores crescentes de proteína bruta, em cada dia de ciclo.

Tratamentos e Abates	Bandas					
	1	2	3	4	5	6
Dia 7 em pH 7						
22% PB	33,88	30,21	2,73	15,95	15,65	1,59
19% PB	34,50	31,57	10,06	15,79	6,68	1,40
15% PB	37,31	31,12	7,31	11,84	10,12	2,29
13% PB	43,97	29,86	3,52	9,95	10,06	2,63
6% PB	43,41	41,15	4,55	4,27	3,90	2,73
Dia 8 em pH 7						
22% PB	27,68	26,15	15,41	18,50	11,02	1,24
19% PB	27,20	31,70	11,89	11,35	15,48	2,39
15% PB	30,80	31,28	16,25	8,73	10,66	2,28
13% PB	29,14	35,38	10,75	8,22	10,83	5,67
6% PB	41,70	20,40	14,61	7,82	8,58	6,88
Dia 9 em pH 7						
22% PB	30,69	26,41	3,90	14,28	14,28	10,44
19% PB	42,91	10,60	2,88	10,85	16,51	16,25
15% PB	24,86	39,24	7,36	11,32	14,14	3,09
13% PB	20,10	61,07	4,68	2,85	8,17	3,13
6% PB	60,24	24,17	5,67	3,33	3,12	3,47
Dia 10 em pH 7						
22% PB	28,95	7,75	17,17	16,91	21,56	7,65
19% PB	40,16	9,02	11,82	15,30	16,34	7,35
15% PB	47,15	16,15	12,96	7,74	11,67	4,34
13% PB	59,41	10,22	11,84	6,69	7,89	3,95
6% PB	39,90	23,59	13,79	5,55	13,77	3,42

Tabela 6: Atividade enzimática arbitrária relativa (U%) em pH 11 das bandas, do trato digestivo de larva de *H. illucens* alimentadas em teores crescentes de proteína bruta, em cada dia de ciclo.

Tratamentos e Abates	Bandas					
	1	2	3	4	5	6
Dia 7 em pH 11						
22% PB	28,69	23,16	7,72	4,59	32,68	3,15
19% PB	25,12	29,15	9,51	18,68	16,01	1,53
15% PB	30,04	33,80	3,33	13,19	17,07	2,58
13% PB	29,17	17,90	18,83	9,08	22,86	2,16
6% PB	31,51	37,45	12,84	8,57	6,82	2,82
Dia 8 em pH 11						
22% PB	25,43	7,07	2,72	36,73	25,51	2,54
19% PB	42,27	23,62	2,31	15,69	14,75	1,37
15% PB	31,98	27,55	4,54	18,16	14,37	3,41
13% PB	30,83	25,38	4,66	17,59	11,87	9,67
6% PB	37,06	22,75	11,45	10,97	8,93	8,83
Dia 9 em pH 11						
22% PB	37,26	12,65	4,56	9,24	20,81	15,48
19% PB	37,89	14,37	12,98	13,62	17,19	3,94
15% PB	33,09	20,78	6,99	18,30	16,73	4,11
13% PB	29,06	11,75	13,63	14,49	12,31	18,76
6% PB	34,82	24,70	4,76	10,80	7,91	17,01
Dia 10 em pH 11						
22% PB	36,11	13,15	4,30	14,03	25,83	6,57
19% PB	45,25	13,69	13,31	10,37	10,54	6,84
15% PB	51,62	9,87	5,49	11,07	12,36	9,58
13% PB	59,92	13,95	11,04	8,97	3,26	2,85
6% PB	40,02	18,67	6,65	17,36	11,76	5,53

4.4 DISCUSSÃO

Os efeitos do dia foram desdobrados com o objetivo de avaliar descritivamente o efeito considerado como principal, os diferentes teores de proteína da dieta na expressão da atividade enzimática.

Nos dípteros, estudos indicam que as proteases mais abundantes são as serino-proteases, especialmente as do tipo tripsina. Essas enzimas são diretamente influenciadas pelo pH, sendo inibidas em meio ácido e apresentando maior atividade em pH próximo de 7 a 8 (Pinilla et al., 2013). Dessa forma, adotou-se o pH 7 como referência, por corresponder à faixa de maior atividade enzimática e permitir a adequada determinação do grupo de proteases.

A redução da expressão da atividade enzimática na banda 1, sugere que o aumento do teor de PB% inibe a atividade proteolítica ou que ocorre ativação desta enzima pela escassez de PB% presente na dieta. Tal fato pode estar associado às dietas de maiores teores proteicos, uma vez que apresentam grãos de cereais e de leguminosas em suas composições, que podem apresentar inibidores de proteases, reduzindo a atividade enzimática (Bonturi et al., 2022; Kårlund et al., 2021). Entretanto, espera-se esses inibidores estejam inativados devido à fermentação anaeróbica (Meijer et al., 1995).

Assim como observado na banda 1, é possível que a inibição da banda 2 esteja associada a dietas com teores proteicos restritivos, próximos de 6%, provocando subnutrição larval. Em contrapartida, a dieta de 13% PB não apresentou restrição proteica para comprometer o crescimento larval. (Schneider et al., 2025b). A banda identificada pode refletir a adaptação larval a dietas hipoproteicas, em resposta à baixa disponibilidade nutricional, ocorre a superexpressão de proteases para otimizar o aproveitamento proteico (Awan et al., 2025).

Já a terceira banda detectada, apresentou valores dispersos entre os teores de PB%, variando de 2,73 UA% à 10,06 UA% nas dietas de 21% e 19% PB respectivamente, sugerindo que não há modulação pelo teor de PB% desta banda.

A atividade enzimática da quarta banda detectada foi maior com elevados teores de PB%. Sugerindo que a disponibilidade de substrato proteico aumenta sua expressão. Como é demonstrado no estudo de Rivera-Ciprian *et al.,* (2017), que demonstrou em dípteros especificamente a *Anastrepha obliqua*, que a proteína dietética é capaz de alterar a expressão proteolítica pela na larva de dípteros.

A atividade da banda 5 variou entre as dietas de 3,90 UA% à 15,65 UA% nas dietas de 6% e 21% PB respectivamente, sugerindo assim como na banda 3, que não há modulação pelo teor de PB% desta banda.

Enquanto para a Banda 6, a atividade enzimática variou entre 1,40 UA% à 2,73 UA% nas dietas de 19 e 6% PB respectivamente, o que sugere que, assim como a banda 1, o teor de proteína elevado possa reduzir sua atividade, ou até mesmo ela ser mais ativa em menores teores proteicos.

4.5 CONCLUSÃO

Os diferentes teores de proteína bruta em dietas a base de RPCH, alteram a atividade proteolítica do trato digestivo de larvas de *H. illucens* em fase de "cria". Em condições de ausência de restrição alimentar, a dieta de 19% PB apresenta maior atividade proteolítica quando comparada com as outras dietas analisadas, o que sugere melhor aproveitamento proteico da dieta.

4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AWAN, Ayesha *et al.* Source of dietary protein alters the abundance of proteases, intestinal epithelial and immune proteins both directly and via interactions with the gut microbiota. **bioRxiv**. 9 jan. 2025.

BONELLI, Marco *et al.* Black Soldier Fly Larvae Adapt to Different Food Substrates through Morphological and Functional Responses of the Midgut. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 14, p. 4955, 13 jul. 2020.

BONTURI, Camila Ramalho *et al.* Plant Kunitz Inhibitors and Their Interaction with Proteases: Current and Potential Pharmacological Targets. **International Journal of Molecular Sciences** MDPI, , 1 maio 2022.

BRASIL. Ofício Circular nº 33. MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento o. 6, 2023.

BROECKX, Laurens *et al.* Growth of black soldier fly larvae reared on organic side-streams. **Sustainability (Switzerland)**, v. 13, n. 23, 1 dez. 2021.

BRUNO, D. *et al.* Review: A journey into the black soldier fly digestive system: From current knowledge to applied perspectives. **animal**, p. 101483, mar. 2025.

BRUNO, Daniele *et al.* The digestive system of the adult *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae): morphological features and functional properties. **Cell and Tissue Research**, v. 378, n. 2, p. 221–238, 1 nov. 2019b.

BRUNO, Daniele *et al.* The Intestinal Microbiota of *Hermetia illucens* Larvae Is Affected by Diet and Shows a Diverse Composition in the Different Midgut Regions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 85, n. 2, 15 jan. 2019a.

CUERVO, Patrícia *et al.* Serine protease activities in Oxysarcodexia thornax (Walker) (Diptera: Sarcophagidae) first instar larva**. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**. *2008*.

FAZITO DO VALE, Vladimir; PEREIRA, Marcos Horácio; GONTIJO, Nelder Figueiredo. Midgut pH profile and protein digestion in the larvae of Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 53, n. 11, p. 1151–1159, nov. 2007.

GIGLIOTI, Rodrigo *et al.* Proteolytic activity of excretory/secretory products of Cochliomyia hominivorax (Diptera: Calliphoridae). **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 36, n. 8, p. 711–718, 2016.

KÅRLUND, Anna *et al.* Intestinal exposure to food-derived protease inhibitors: Digestion physiology-and gut health-related effects. **Healthcare (Switzerland)** MDPI AG , 1 ago. 2021.

MENEGUZ, Marco *et al.* Effect of rearing substrate on growth performance, waste reduction efficiency and chemical composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 15, p. 5776–5784, 1 dez. 2018.

MERTENS, D. R. Creating a System for Meeting the Fiber Requirements of Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 7, p. 1463–1481, jul. 1997.

LU, Leihao *et al.* Proteomic Study Reveals Major Pathways Regulating the Development of Black Soldier Fly. **Journal of Proteome Research**, v. 20, n. 5, p. 2216–2223, 7 maio 2021.

LENI, Giulia; CALIGIANI, Augusta; SFORZA, Stefano. Killing method affects the browning and the quality of the protein fraction of Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) prepupae: a metabolomics and proteomic insight. **Food Research International**, v. 115, p. 116–125, 1 jan. 2019.

MEIJER, M. M. T. *et al.* Inactivation of proteinaceous protease inhibitors of soybeans by isolated fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 4, n. 2, p. 147–154, jul. 1995.

OGELLO, Erick O. *et al.* Optimizing Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) production: effects of substrate variation on biomass, nutritional quality, hatchability, fecundity, and *frass* quality. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 9, 2025.

PINILLA, Yudi T. *et al.* Proteolytic activity regarding Sarconesiopsis magellanica (Diptera: Calliphoridae) larval excretions and secretions. **Acta Tropica**, v. 128, n. 3, p. 686–691, dez. 2013.

PRADABPHETRAT, Piyaruk; SATHAWONG, Sidthipong; PIMSEN, Montakarn. Effects of Rearing Black Soldier Fly Larvae (*Hermetia illucens*) from Organic Wastes. **ASEAN Journal of Scientific and Technological Reports**, v. 27, n. 4, p. e252644, 30 jun. 2024.

RIVERA-CIPRIAN, José Pedro *et al.* Midgut Protease Activity During Larval Development of Anastrepha obliqua (Diptera: Tephritidae) Fed With Natural and Artificial Diet. **Journal of Insect Science**, v. 17, n. 6, 1 nov. 2017.

SCHNEIDER, L. *et al.* Performance and nutrient composition of black soldier fly larvae fed diets with various protein concentrations throughout the life cycle. **Animal**, v. 19, n. 10, 1 out. 2025a.

SCHNEIDER, Laura *et al.* Dietary Protein Levels in Isoenergetic Diets Affect the Performance, Nutrient Utilization and Retention of Nitrogen and Amino Acids of *Hermetia illucens* (L.) (Diptera: Stratiomyidae) Larvae. **Insects**, v. 16, n. 3, 1 mar. 2025b.

WAKUDA, Megumi *et al.* High expression of serine protease, Brachyurin in the posterior midgut of black soldier fly (*Hermetia illucens*) during horse dropping processing. **BMC Research Notes**, v. 17, n. 1, p. 182, 29 jun. 2024.

ZHANG, Jibin; YANG, Sen; REHMAN, Kashif ur. Editorial: Gut microbiome in black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) larvae: symbiosis, function, and application. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, 21 jun. 2024.

ZHANG, Qi Hui; PUNIAMOORTHY, Nalini. Impact of Rearing Substrates on Black Soldier Fly Growth and Fertility: A Semi-Industrial Scale Study to Optimize Egg Collection. **Insects** , v. 16, n. 2, 1 fev. 2025.

5. CONCLUSÕES GERAIS

Estudos referente a produção da larva de *Hermetia illucens* estão sendo desenvolvidos, entretanto, ainda sem que haja o discernimento das fases de criação, separando a cria e recria. De modo que os estudos em sua maioria, contemplam a fase de recria somente. Com o presente estudo, desenvolvido na fase de cria, conclui-se que o aumento dos teores de proteína bruta dietética em dietas a base de resíduo pré-consumo humano na fase de cria promove melhora dos índices produtivos da criação de larvas de *H. illucens*. Em que dietas com teores entre 19-22% PB apresentam melhores índices produtivos, com 7 dias de criação, sendo o de 19% PB o de melhor desempenho, e o excesso de nitrogênio promove maiores perdas nitrogenadas. Além disso, a alteração do teor proteico é capaz de alterar a atividade proteolítica do trato digestivo das larvas de *H. illucens*, em que as larvas alimentadas com 19% PB apresentaram maiores atividades proteolíticas, sugerindo melhor aproveitamento da dieta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM,T. R. *et al.* Nitrogen metabolism and protein requirements for maintenance of growing Red Norte bulls. **Animal**, v. 14, n. 4, p. 763–770, 2020.

AMRUL, Nur Fardilla *et al.* A Review of Organic Waste Treatment Using Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*). **Sustainability (Switzerland)**, v. 14, n. 8, 1 abr. 2022.

AOAC - Association of Official Analytical Chemistry. 1995. Official methods of analysis. 16th ed. AOAC International, Arlington, VA.

ARABZADEH, Ghazaleh *et al.* Diet Composition Influences Growth Performance, Bioconversion of Black Soldier Fly Larvae: Agronomic Value and In Vitro Biofungicidal Activity of Derived *Frass*. **Agronomy**, v. 12, n. 8, p. 1765, 27 jul. 2022.

ARAUJO, L. F; ZANETTI, M. A. Nutrição Animal. 1. ed. Barueri: Manole, 2019. v. 1. 355p

ARRESE, Estela L.; SOULAGES, Jose L. Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation. **Annual Review of Entomology**, v. 55, n. 1, p. 207–225, 1 jan. 2010.

AWAN, Ayesha *et al.* Source of dietary protein alters the abundance of proteases, intestinal epithelial and immune proteins both directly and via interactions with the gut microbiota. **bioRxiv**. 9 jan. 2025.

BARRAGAN-FONSECA, Karol B.; DICKE, Marcel; VAN LOON, Joop J. A. Influence of larval density and dietary nutrient concentration on performance, body protein, and fat contents of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*). **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 166, n. 9, p. 761–770, 1 set. 2018.

BARRETT, M. *et al.* Welfare considerations for farming black soldier flies, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae): a model for the insects as food and feed industry. **Journal of Insects as Food and Feed**, v. 9, n. 2, p. 119–148, 2023.

BARROS-CORDEIRO, Karine Brenda; BÁO, Sônia Nair; PUJOL-LUZ, José Roberto**.** Intra-puparial development of the black soldier-fly, *Hermetia illucens*. **Journal of Insect Science.** 2014

BEESIGAMUKAMA, Dennis *et al.* Exploring Black Soldier Fly *Frass* as Novel Fertilizer for Improved Growth, Yield, and Nitrogen Use Efficiency of Maize Under Field Conditions. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, 23 set. 2020.

BEKKER, Nicolai Sundgaard *et al.* Impact of substrate moisture content on growth and metabolic performance of black soldier fly larvae. **Waste Management**, v. 127, p. 73–79, 15 maio 2021.

BOGDAN, Georgescu *et al.* A Comprehensive Method for the Evaluation of *Hermetia illucens* Egg Quality Parameters: Implications and Influence Factors. **Insects**, v. 13, n. 1, p. 17, 23 dez. 2021.

BOHM, Kristin *et al.* Black Soldier Fly-based bioconversion of biosolids creates high-value products with low heavy metal concentrations. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 180, 1 maio 2022.

BONELLI, Marco *et al.* Black Soldier Fly Larvae Adapt to Different Food Substrates through Morphological and Functional Responses of the Midgut. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 14, p. 4955, 13 jul. 2020.

BONTURI, Camila Ramalho *et al.* Plant Kunitz Inhibitors and Their Interaction with Proteases: Current and Potential Pharmacological Targets. **International Journal of Molecular Sciences** MDPI, , 1 maio 2022.

BOSCH, G. *et al.* Standardisation of quantitative resource conversion studies with black soldier fly larvae. **Journal of Insects as Food and Feed**, v. 6, n. 2, p. 95–109, 8 abr. 2020.

BRASIL. Ofício Circular nº 33. MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento o. 6, 2023.

BROECKX, Laurens *et al.* Growth of black soldier fly larvae reared on organic side-streams. **Sustainability (Switzerland)**, v. 13, n. 23, 1 dez. 2021.

BROGAN, Emily N. *et al.* Characterization of protein in cricket (Acheta domesticus), locust (Locusta migratoria), and silk worm pupae (Bombyx mori) insect powders. **LWT**, v. 152, 1 dez. 2021.

BRUNO, D. *et al.* Review: A journey into the black soldier fly digestive system: From current knowledge to applied perspectives. **animal**, p. 101483, mar. 2025.

BRUNO, Daniele *et al.* An in-depth description of head morphology and mouthparts in larvae of the black soldier fly *Hermetia illucens*. **Arthropod Structure and Development**, v. 58, 1 set. 2020.

BRUNO, Daniele *et al.* The digestive system of the adult *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae): morphological features and functional properties. **Cell and Tissue Research**, v. 378, n. 2, p. 221–238, 1 nov. 2019b.

BRUNO, Daniele *et al.* The Intestinal Microbiota of *Hermetia illucens* Larvae Is Affected by Diet and Shows a Diverse Composition in the Different Midgut Regions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 85, n. 2, 15 jan. 2019.

BURSELL, E. **The Excretion of Nitrogen in Insects**. *[S.l.: S.n.]*. 1967.

CACCIA, Silvia; CASARTELLI, Morena; TETTAMANTI, Gianluca. The amazing complexity of insect midgut cells: types, peculiarities, and functions. **Cell and Tissue Research**, v. 377, n. 3, p. 505–525, 29 set. 2019.

CHAKRABARTI, Ajoy C.; DEAMER, David W. Permeation of Membranes by the Neutral Form of Amino Acids and Peptides: Relevance to the Origin of Peptide Translocation. **Journal of Molecular Evolution**, v. 39, p. 1–5, 1994.

CHAPAGAEE, Pawan *et al.* Valorisation of organic wastes through black soldier fly (*Hermetia illucens*) Larvae: Impacts on Growth, nutritional Composition, and bioconversion efficiency. **Waste Management Bulletin**, p. 100278, dez. 2025.

CHENG, Jack Y. K.; CHIU, Sam L. H.; LO, Irene M. C. Effects of moisture content of food waste on residue separation, larval growth and larval survival in black soldier fly bioconversion. **Waste Management**, v. 67, p. 315–323, 1 set. 2017.

CHIA, Shaphan Yong *et al.* Threshold temperatures and thermal requirements of black soldier fly *Hermetia illucens*: Implications for mass production. **PLoS ONE**, v. 13, n. 11, 1 nov. 2018.

CUERVO, Patrícia *et al.* Serine protease activities in Oxysarcodexia thornax (Walker) (Diptera: Sarcophagidae) first instar larva**. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**. *2008*.

DE FILIPPIS, Francesca *et al.* Plastics shape the black soldier fly larvae gut microbiome and select for biodegrading functions. **Microbiome**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2023.

DE SMET, Jeroen *et al.* Microbial Community Dynamics during Rearing of Black Soldier Fly Larvae (*Hermetia illucens*) and Impact on Exploitation Potential. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 9, maio 2018.

DETMANN, E.; RODRIGUES, J. P. P.; DA SILVA, T. E.; BRITO NETO, A. de S.; FRANCO, M. de O. **Methods for feed analysis**. 3. ed. Viçosa, MG: Suprema Gráfica, 2025.

DILELIS, F. *et al.* Low-level inclusion of full-fat black soldier fly larvae meal as a functional ingredient in broiler diets. **Journal of Insects as Food and Feed**, p. 1–12, 13 ago. 2025.

DOS SANTOS, Neiri J. A. *et al.* Performance, Digestibility, Nitrogen Balance and Ingestive Behavior of Young Feedlot Bulls Supplemented with Palm Kernel Oil. **Animals**, v. 12, n. 4, p. 429, 11 fev. 2022.

DUBREUIL, Ronald R. Copper cells and stomach acid secretion in the Drosophila midgut. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, n. 5, p. 742–752, maio 2004.

DZEPE, Daniel *et al.* Feeding strategies for small-scale rearing black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) as organic waste recycler. **SN Applied Sciences**, v. 3, n. 2, p. 252, 2 fev. 2021.

EBENEEZAR, Sanal *et al.* Nutritional evaluation, bioconversion performance and phylogenetic assessment of black soldier fly (*Hermetia illucens*, Linn. 1758) larvae valorized from food waste. **Environmental Technology & Innovation**, v. 23, p. 101783, ago. 2021.

EGGINK, K. M.; DONOSO, I. G.; DALSGAARD, J. Optimal dietary protein to carbohydrate ratio for black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. **Journal of Insects as Food and Feed**, v. 9, n. 6, p. 789–798, 26 maio 2023.

EKE, Maurielle *et al.* Deciphering the functional diversity of the gut microbiota of the black soldier fly (*Hermetia illucens*): recent advances and future challenges. **Animal Microbiome**, v. 5, n. 1, p. 40, 31 ago. 2023.

EWALD, Nils *et al.* Fatty acid composition of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) – Possibilities and limitations for modification through diet. **Waste Management**, v. 102, p. 40–47, 1 fev. 2020.

FAZITO DO VALE, Vladimir; PEREIRA, Marcos Horácio; GONTIJO, Nelder Figueiredo. Midgut pH profile and protein digestion in the larvae of Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 53, n. 11, p. 1151–1159, nov. 2007.

FEDIAF. Nutritional guidelines for complete and complementary pet food for cats and dogs. Belgica: Bruxelas (2021)

FITRIANA, E. L.; LACONI, E. B.; JAYANEGARA, A. Influence of various organic wastes on growth performance and nutrient composition of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*): A meta-analysis. *In*: IOP Publishing Ltd, 28 jun. 2021.

FOWLES, Trevor M.; NANSEN, Christian. Insect-Based Bioconversion: Value from Food Waste. *In*: **Food Waste Management**. Cham: Springer International Publishing, 2020. p. 321–346.

FRANCIS, Aditya; SCHMITT, Eric; SMETANA, Sergiy. Making better Bugs: Improving black soldier fly production for a more sustainable future. **Journal of Cleaner Production**, v. 521, p. 146240, ago. 2025.

FREEL, Tarra A.; MCCOMB, Alejandra; KOUTSOS, Elizabeth A. Digestibility and safety of dry black soldier fly larvae meal and black soldier fly larvae oil in dogs. **Journal of Animal Science**, v. 99, n. 3, 1 mar. 2021.

FURTADO, Rafael Nogueira *et al.* Intake, digestibility and nitrogen balance in sheep fed diets containing detoxified castor cake. **Revista ciência agronômica**, v. 51, n. 1, 2020.

GABIATTI, Claudio *et al.* Characterization of dietary fiber from residual cellulose sausage casings using a combination of enzymatic treatment and high-speed homogenization. **Food Hydrocolloids**, v. 100, p. 105398, mar. 2020.

GÄRTTLING, Daniel; SCHULZ, Hannes. Compilation of Black Soldier Fly *Frass* Analyses. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 22, n. 1, p. 937–943, 1 mar. 2022.

GESSERT, C. F.; PHILLIPS, P. H. Protein in the Nutrition of the Growing Dog. **The Journal of Nutrition**, v. 58, n. 3, p. 415–421, mar. 1956.

GHAFFARI, M. H.; DRACKLEY, J. K.; KERTZ, A. F. Invited review: Unlocking growth and development potential in dairy calves through precision protein feeding. **Journal of Dairy Science**, v. 108, n. 7, p. 6601–6616, jul. 2025.

GIANNETTI, Daniele *et al.* Do It by Yourself: Larval Locomotion in the Black Soldier Fly *Hermetia illucens*, with a Novel "Self-Harvesting" Method to Separate Prepupae. **Insects**, v. 13, n. 2, 1 fev. 2022.

GIGLIOTI, Rodrigo *et al.* Proteolytic activity of excretory/secretory products of Cochliomyia hominivorax (Diptera: Calliphoridae). **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 36, n. 8, p. 711–718, 2016.

GLIGORESCU, Anton *et al.* Development, growth and metabolic rate of *Hermetia illucens* larvae. **Journal of Applied Entomology**, v. 143, n. 8, p. 875–881, 19 set. 2019.

GUIDINI LOPES, Ivã *et al.* Dynamics of black soldier fly larvae composting – Impact of substrate properties and rearing conditions on process efficiency. **Waste Management**, v. 172, p. 25–32, 1 dez. 2023.

GUILLAUME, J. B. *et al.* Amylase activity across black soldier fly larvae development and feeding substrates: insights on starch digestibility and external digestion. **Animal**, v. 18, n. 11, 1 nov. 2024.

HADJ SAADOUN, Jasmine *et al.* Lipid profile and growth of black soldier flies (*Hermetia illucens*, Stratiomyidae) reared on by-products from different food chains. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, n. 9, p. 3648–3657, 1 jul. 2020.

HAUSCHILD, L.; POMAR, C.; LOVATTO, P. A. Systematic comparison of the empirical and factorial methods used to estimate the nutrient requirements of growing pigs. **Animal**, v. 4, n. 5, p. 714–723, 2010.

HOLTOF, Michiel *et al.* Extracellular nutrient digestion and absorption in the insect gut. **Cell and Tissue Research** Springer Verlag , 1 set. 2019.

HOPKINS, Indee *et al.* The influence of food waste rearing substrates on black soldier fly larvae protein composition: A systematic review. **Insects.** MDPI AG, , 1 jul. 2021.

HOSSEINDOUST, Abdolreza *et al.* Quality Characteristics of Black Soldier Flies Produced by Different Substrates. **Insects**, v. 14, n. 6, 1 jun. 2023.

HUYLER, M. T.; KINCAID, R. L. The relationship between intestinally available protein and detergent insoluble protein of feedstuffs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 78, n. 1–2, p. 101–107, mar. 1999.

IMPERATRIZ-FONSECA, Vera Lucia; NUNES-SILVA, Patrícia. As abelhas, os serviços ecossistêmicos e o Código Florestal Brasileiro. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 4, p. 59–62, dez. 2010.

IP, Yuen K.; CHEW, Shit F. Air-breathing and excretory nitrogen metabolism in fishes. **Acta Histochemica**, v. 120, n. 7, p. 680–690, out. 2018.

JASSO, Beatrice *et al.* Black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) *frass* and sheddings as a compost ingredient. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 7, 2023.

JESUS, Andressa Pereira de *et al.* Agronomic Efficiency of Compost Extracts and Nitrogen-Fixing Bacteria in Soybean Crops. **Microorganisms**, v. 13, n. 2, p. 341, 5 fev. 2025.

KÅRLUND, Anna *et al.* Intestinal exposure to food-derived protease inhibitors: Digestion physiology-and gut health-related effects. **Healthcare (Switzerland)** MDPI AG , 1 ago. 2021.

KIM, Wontae *et al.* Biochemical characterization of digestive enzymes in the black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 14, n. 1, p. 11–14, mar. 2011.

KLAMMSTEINER, Thomas *et al.* Larval density drives thermogenesis and affects microbiota and substrate properties in black soldier fly trials. **iScience**, v. 28, n. 7, 18 jul. 2025.

LALANDER, C. *et al.* Effects of feedstock on larval development and process efficiency in waste treatment with black soldier fly (*Hermetia illucens*). **Journal of Cleaner Production**, v. 208, p. 211–219, 20 jan. 2019.

LALANDER, Cecilia *et al.* Process efficiency and ventilation requirement in black soldier fly larvae composting of substrates with high water content. **Science of the Total Environment**, v. 729, 10 ago. 2020.

LEE, Dong Jun *et al.* Tracking carbon and nitrogen flow in black soldier fly larvae cultivation: Effects of feed carbohydrate-to-protein ratio. **Journal of Environmental Management**, v. 397, 1 jan. 2026.

LEE, Kwang Pum *et al.* Lifespan and reproduction in *Drosophila*: New insights from nutritional geometry. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 7, p. 2498–2503, 19 fev. 2008.

LEESON, S.; SUMMERS, J. D.; CASTON, L. J. Response of Broilers to Feed Restriction or Diet Dilution in the Finisher Period. **Poultry Science**, v. 71, n. 12, p. 2056–2064, dez. 1992.

LENI, Giulia; CALIGIANI, Augusta; SFORZA, Stefano. Killing method affects the browning and the quality of the protein fraction of Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) prepupae: a metabolomics and proteomic insight. **Food Research International**, v. 115, p. 116–125, 1 jan. 2019.

LIEVENS, Siebe *et al.* Ingestion and excretion dynamics of microplastics by black soldier fly larvae and correlation with mouth opening size. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, 1 dez. 2023.

LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

LU, Leihao *et al.* Proteomic Study Reveals Major Pathways Regulating the Development of Black Soldier Fly. **Journal of Proteome Research**, v. 20, n. 5, p. 2216–2223, 7 maio 2021.

MAKKAR, Harinder P. S. *et al.* State-of-the-art on use of insects as animal feed. **Animal Feed Science and Technology**, v. 197, p. 1–33, nov. 2014.

MANI, Kannan *et al.* Effect of entomopathogenic fungus Beauveria bassiana on the growth characteristics and metabolism of black soldier fly larvae. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 197, p. 105684, dez. 2023.

MARTINS, Márcio R. *et al.* A simple and easy method to measure ammonia volatilization: Accuracy under field conditions. **Pedosphere**, v. 31, n. 2, p. 255–264, abr. 2021.

MEIJER, M. M. T. *et al.* Inactivation of proteinaceous protease inhibitors of soybeans by isolated fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 4, n. 2, p. 147–154, jul. 1995.

MENEGUZ, Marco *et al.* Effect of rearing substrate on growth performance, waste reduction efficiency and chemical composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 15, p. 5776–5784, 1 dez. 2018.

MERTENS, D. R. Creating a System for Meeting the Fiber Requirements of Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 7, p. 1463–1481, jul. 1997.

MIGUEL-ALIAGA, Irene; JASPER, Heinrich; LEMAITRE, Bruno. Anatomy and Physiology of the Digestive Tract of Drosophila melanogaster. **Genetics**, v. 210, n. 2, p. 357–396, 1 out. 2018.

NAKAMURA, Satoshi *et al.* Small-scale rearing of the black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae), in the laboratory: low-cost and year-round rearing. **Applied Entomology and Zoology**, v. 51, n. 1, p. 161–166, 12 fev. 2016.

NGUYEN, Trinh T. X.; TOMBERLIN, Jeffery K.; VANLAERHOVEN, Sherah. Influence of Resources on *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) Larval Development. **Journal of Medical Entomology**, v. 50, n. 4, p. 898–906, 1 jul. 2013.

NIU, Li *et al.* The effect of ball milling on the structure, physicochemical and functional properties of insoluble dietary fiber from three grain bran. **Food Research International**, v. 163, p. 112263, jan. 2023.

NRC. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. Estados Unidos: Washington (2021)

O'DONNELL, M. J.; DONINI, Andrew. Nitrogen Excretion and Metabolism in Insects. *In*: **Acid-Base Balance and Nitrogen Excretion in Invertebrates**. *[S.l.]*: Springer International Publishing, 2017. p. 109–126.

ODDON, Sara Bellezza *et al.* Black soldier fly life history traits can be influenced by isonutrient-waste-based diets. **Italian Journal of Animal Science**, v. 23, n. 1, p. 331–341, 2024.

ODDON, Sara Bellezza; BIASATO, Ilaria; GASCO, Laura. Isoenergetic-practical and semi-purified diets for protein requirement determination in *Hermetia illucens* larvae: consequences on life history traits. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 13, n. 1, 1 dez. 2022.

OGELLO, Erick O. *et al.* Optimizing Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) production: effects of substrate variation on biomass, nutritional quality, hatchability, fecundity, and *frass* quality. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 9, 2025.

OJHA, Shikha; BUSSLER, Sara; SCHLÜTER, Oliver K. Food waste valorisation and circular economy concepts in insect production and processing. **Waste Management**, v. 118, p. 600–609, dez. 2020.

OVANI, Vagner S. *et al.* Use of internal markers to estimate feed intake and selection of forage in sheep fed grass and legume hay. **Animal Feed Science and Technology**, v. 283, p. 115177, jan. 2022.

PEGUERO, Daniela A. *et al.* Evaluation of ammonia pretreatment of four fibrous biowastes and its effect on black soldier fly larvae rearing performance. **Waste Management**, v. 160, p. 123–134, abr. 2023.

PINILLA, Yudi T. *et al.* Proteolytic activity regarding Sarconesiopsis magellanica (Diptera: Calliphoridae) larval excretions and secretions. **Acta Tropica**, v. 128, n. 3, p. 686–691, dez. 2013.

PLIANTIANGTAM, Nichaphon; CHUNDANG, Pipatpong; KOVITVADHI, Attawit. Growth performance, waste reduction efficiency and nutritional composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae and prepupae reared on coconut endosperm and soybean curd residue with or without supplementation. **Insects**, v. 12, n. 8, 1 ago. 2021.

PRADABPHETRAT, Piyaruk; SATHAWONG, Sidthipong; PIMSEN, Montakarn. Effects of Rearing Black Soldier Fly Larvae (*Hermetia illucens*) from Organic Wastes. **ASEAN Journal of Scientific and Technological Reports**, v. 27, n. 4, p. e252644, 30 jun. 2024.

QIN, Wenjie *et al.* Effects of biochar amendment on bioconversion of soybean dregs by black soldier fly. **Science of The Total Environment**, v. 829, p. 154605, jul. 2022.

REHMAN, Kashif ur *et al.* Conversion of mixtures of dairy manure and soybean curd residue by black soldier fly larvae (*Hermetia illucens* L.). **Journal of Cleaner Production**, v. 154, p. 366–373, jun. 2017.

RESENDE, Kleber Tomás de *et al.* Avaliação das exigências nutricionais de pequenos ruminantes pelos sistemas de alimentação recentemente publicados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. spe, p. 161–177, jul. 2008.

RIVERA-CIPRIAN, José Pedro *et al.* Midgut Protease Activity During Larval Development of Anastrepha obliqua (Diptera: Tephritidae) Fed With Natural and Artificial Diet. **Journal of Insect Science**, v. 17, n. 6, 1 nov. 2017.

ROSTAGNO, H. S. *et al*. Tabelas brasileiras para aves e suínos –composição de alimentos e exigências nutricionais. 5 ed. 2024. Universidade de viçosa.

SAKOMURA, N. K.; ROSTAGNO, H. S. Métodos de pesquisa em nutrição de monogástricos. Jaboticabal, 2 ed. Jaboticabal, FUNEP, 2016

SANTOS, Simone Aparecida dos; VIDIGAL, Pedrina Gonçalves; MERLINI, Luis Sérgio. A criação do Bombyx mori (Bicho-da-seda) e as principais doenças**. Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR**. *[S.l.: S.n.]*.

SCHNEIDER, J. C. Effects of light intensity on mating of the black soldier fly (*Hermetia illucens*, Diptera: Stratiomyidae). **Journal of Insects as Food and Feed**, v. 6, n. 2, p. 111–120, 8 abr. 2020.

SCHNEIDER, L. *et al.* Performance and nutrient composition of black soldier fly larvae fed diets with various protein concentrations throughout the life cycle. **Animal**, v. 19, n. 10, 1 out. 2025a.

SCHNEIDER, Laura *et al.* Dietary Protein Levels in Isoenergetic Diets Affect the Performance, Nutrient Utilization and Retention of Nitrogen and Amino Acids of *Hermetia illucens* (L.) (Diptera: Stratiomyidae) Larvae. **Insects**, v. 16, n. 3, 1 mar. 2025b.

SCHREVEN, Stijn J. J. *et al.* Black Soldier Fly Larvae Influence Internal and Substrate Bacterial Community Composition Depending on Substrate Type and Larval Density. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 88, n. 10, 24 maio 2022.

SEYEDALMOOSAVI, Mohammad M. *et al.* Growth efficiency, intestinal biology, and nutrient utilization and requirements of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae compared to monogastric livestock species: a review. **Journal of Animal Science and Biotechnology**. BioMed Central Ltd, , 1 dez. 2022.

SHAO, Mingying *et al.* Synergistic bioconversion of organic waste by black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae and thermophilic cellulose-degrading bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, 10 jan. 2024.

SHEPPARD, D. Craig *et al.* A value added manure management system using the black soldier fly**. Bioresource Technology**.

SHEPPARD, D. Craig *et al.* Rearing Methods for the Black Soldier Fly (Diptera: Stratiomyidae). **J. Med. Entomol**. 2002.

SIDDIQUI, Shahida Anusha *et al.* Black soldier fly larvae (BSFL) and their affinity for organic waste processing. **Waste Management** Elsevier Ltd, , 1 mar. 2022.

SIDDIQUI, Shahida Anusha *et al.* Enhancing the bioconversion rate and end products of black soldier fly (BSF) treatment – A comprehensive review. **Environment, Development and Sustainability.** Springer Science and Business Media B.V., 2025.

SILVARAJU, Shaktheeshwari *et al.* Evolution under Domestication: Genetic differentiation in black soldier fly (*Hermetia illucens*) populations subjected to recent selective breeding. **bioRxiv.** 18 abr. 2025.

SIMPSON, Stephen J.; RAUBENHEIMER, David. Macronutrient balance and lifespan. **Aging**, v. 1, n. 10, p. 875–880, 22 out. 2009.

SMETS, Ruben; CLAES, Johan; VAN DER BORGHT, Mik. On the nitrogen content and a robust nitrogen-to-protein conversion factor of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 413, n. 25, p. 6365–6377, 11 out. 2021.

SNIFFEN, C. J. *et al.* A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 11, p. 3562–3577, 1 nov. 1992.

SOUZA, Fernando Augusto de; MALHEIROS, Euclides Braga; CARNEIRO, Paulo Roberto Oliveira. Positioning and number of nutritional levels in dose-response trials to estimate the optimal-level and the adjustment of the models. **Ciência Rural**, v. 44, n. 7, p. 1204–1209, jul. 2014.

SPRANGHERS, Thomas *et al.* Nutritional composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) prepupae reared on different organic waste substrates. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 8, p. 2594–2600, 1 jun. 2017.

TARIQ, Muhammad Raheel *et al.* Black Soldier Fly: A Keystone Species for the Future of Sustainable Waste Management and Nutritional Resource Development: A Review. **Insects** Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 1 ago. 2025.

TOMBERLIN, Jeffery K.; ADLER, Peter H.; MYERS, Heidi M. Development of the black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) in relation to temperature. **Environmental Entomology**, v. 38, n. 3, p. 930–934, jun. 2009.

UJVARI, Beata *et al.* Experimental studies of blowfly (Calliphora stygia) longevity: A little dietary fat is beneficial but too much is detrimental. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 154, n. 3, p. 383–388, nov. 2009.

VIK, Jostein *et al.* Balanced readiness level assessment (BRLa): A tool for exploring new and emerging technologies. **Technological Forecasting and Social Change**, v. 169, p. 120854, ago. 2021.

WAKUDA, Megumi *et al.* High expression of serine protease, Brachyurin in the posterior midgut of black soldier fly (*Hermetia illucens*) during horse dropping processing. **BMC Research Notes**, v. 17, n. 1, p. 182, 29 jun. 2024.

WANG, Yu *et al.* Relationship of black soldier fly larvae (BSFL) gut microbiota and bioconversion efficiency with properties of substrates. **Waste Management**, v. 180, p. 106–114, maio 2024.

WANG, Yu Shiang; SHELOMI, Matan. Review of black soldier fly (*Hermetia illucens*) as animal feed and human food. **Foods.** MDPI AG, , 1 out. 2017.

YAKTI, Wael *et al.* Physical Properties of Substrates as a Driver for *Hermetia illucens* (L.) (Diptera: Stratiomyidae) Larvae Growth. **Insects**, v. 14, n. 3, 1 mar. 2023.

YILDIRIM-AKSOY, Mediha; ELJACK, Rashida; BECK, Benjamin H. Nutritional value of *frass* from black soldier fly larvae, *Hermetia illucens*, in a channel catfish, Ictalurus punctatus, diet. **Aquaculture Nutrition**, v. 26, n. 3, p. 812–819, 30 jun. 2020.

ZHANG, Jibin; YANG, Sen; REHMAN, Kashif ur. Editorial: Gut microbiome in black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) larvae: symbiosis, function, and application. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, 21 jun. 2024.

ZHANG, Qi Hui; PUNIAMOORTHY, Nalini. Impact of Rearing Substrates on Black Soldier Fly Growth and Fertility: A Semi-Industrial Scale Study to Optimize Egg Collection. **Insects** , v. 16, n. 2, 1 fev. 2025.

ZHANG, Xin *et al.* Structural, extraction and safety aspects of novel alternative proteins from different sources. **Food Chemistry**, v. 436, p. 137712, mar. 2024.

ZHAO, Shanshan *et al.* Synergistic reshaping of nitrogen flow by black soldier fly and gut ammonia-assimilating bacteria: Green transformation from nitrogenous waste to insect protein. **Environmental Technology and Innovation**, v. 40, 1 nov. 2025.

ZULKIFLI, Nor Fatin Najihah Mohamad *et al.* Nutritional value of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae processed by different methods. **PLoS ONE**, v. 17, n. 2 February, 1 fev. 2022.

ANEXOS

Anexo A – CEUA, Código e saída estatística

INSTITUTO DE ZOOTECNIA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA-IZ/UFRRJ

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta de pesquisa intitulada **"Inovação da produção sustentável da larva da Hermetia illucens: otimização dos processos de produção animal no Estado do Rio de Janeiro."** – processo nº 0234-02-2025 – de responsabilidade do Dr. Vinicius Pimentel Silva e equipe; que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Arthropoda foi encaminhada à Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/IZ/UFRRJ) em 04/02/2025 e apresentada na LXVII Reunião desta CEUA em 17/05/2025, sendo assim uma proposta registrada e com ciência da CEUA/IZ/UFRRJ.

Finalidade da Proposta: pesquisa
Vigência da Proposta: maio de 2027
Área: Zootecnia – Nutrição e alimentação animal
Origem: Let´s Fly (Cachoeiras de Macacu-RJ)
Espécie (quantidade): *Hermetia illucens* (ordem de milhares larvas)

"Resumo: A larva da mosca soldado negro (BSFL) é um dos insetos mais estudados para a conversão de resíduos orgânicos, pois além de resolver o problema ambiental, fornece ingredientes de alto valor nutritivo e biocomposto para ser utilizado na produção de alimentos. As empresas Videverde e LetsFly atuam na compostagem de material orgânico e identificaram oportunidade econômica para o estado do Rio de Janeiro de produtos inovadores a partir da BSFL. Juntas, pretendem interagem com a universidade em busca de soluções tecnológicas e inovadoras na utilização da BSFL. A pesquisa será realizada na empresa Vide Verde, no Instituto de Zootecnia através do PPGCA (Programa de pós-graduação em Zootecnia. Trata-se da execução de dois projetos de pesquisa em parceria com a iniciativa privada e aprovados por diferentes órgãos de fomento. O primeiro projeto foi aprovado na FAPERJ e possui vigência de 2 anos iniciados em 2024. Financiamento: no valor de 1.499.485,55.Título: Homo Circularis": a inovação circulando entre o setor produtivo e a academia. Proc. E-26/290.012/2023. A empresa responsável é a Letsfly e Videverde Compostagem LTDA. Em parceria com a UFRRJ levantaram os seguintes objetivos que competem ao IZ: estudar os efeitos de diferentes dietas no tempo de abate, composição química, parâmetros zootécnicos das larvas vivas, abatidas e de suas farinhas integrais; Fortalecimento de ESG, economia circular e ODS em diferentes setores por meio da realização de cursos de capacitação profissional e realização de evento no tema da proposta. Espera-se: (1) estreitar os laços entre o setor produtivo e a geração de conhecimento alicerçada na formação de recursos humanos de alto nível nas universidades; (2) desenvolver e validar industrialmente técnicas, produtos e serviços inovadores para alimentação animal. O segundo projeto foi aprovado pelo FINEP – INOVADOC – n° 0635/23 – no valor de 4.996.377,37. Prazo Total de Execução: 48 meses; Linha Temática: Biotech. Com o seguinte tema: Larva do inseto Hermetia illucens é alimento de impacto: otimização da bioconversão de resíduos orgânicos e m produtossustentáveis e inovadores. Aprovou-se o projeto FINEP. O primeiro ano de execução será em 2025. Conta com os seguintes objetivos: 1) desenvolver sistema de produção de BSF por meio da elaboração de dietas otimizadas originadas a partir de resíduos orgânicos; 2) entender o efeito de diferentes dietas na composição química e os parâmetros de produção das larvas vivas e da farinha. 3)- Desenvolver equações de calibração NIRS para uso real time no sistema de produção. 4) patentes de curvas de calibração de resíduos orgânicos. Os ensaios serão realizados tanto nas instalações da empresa quanto nas dependências da UFRRJ. A área foi cedida pela administração da fazenda e localiza-se em um cômodo dentro da cunicultura. Os desenhos experimentais serão inteiramente casualizados, com no mínimo 5 repetições. Espera-se: (1) estreitar os laços entre o setor produtivo e a geração de conhecimento alicerçada na formação de recursos humanos de alto nível nas universidades ; (2) desenvolver e validar industrialmente técnicas, produtos e serviços inovadores para alimentação animal, que atendam às demandas do setor produtivo e (3) fortalecer a cadeia produtiva da bioeconomia com foco no desenvolvimento de matérias-primas e ingredientes sustentáveis, visando novas oportunidades de negócios e geração de renda dentro do Estado do Rio de Janeiro."

Seropédica, 17 de maio de 2025

Rodrigo Vasconcelos de Oliveira

Prof. Dr. Rodrigo Vasconcelos de Oliveira
Coordenador da CEUA/IZ/UFRRJ

BR 465, Km 7 / Campus da UFRRJ - Seropédica - Rio de Janeiro - CEP: 23.890-000, ceua.iz.ufrrj@gmail.com

```
data nicolas3;
input Nivel_PB Rep Dias MLMN MFMN MLMS MFMS MSL MSF PBL PBF EEL BCLMN BCLMS BCFMN BCFMS NLA PMLmg gPBL gPBF gNL gNF PerdaN
;
cards;
21.6 1 7 148.65 141.55 27.74 47.92 18.66 33.86 35.30 17.65 32.96 20.65 24.50 19.66 42.34 5473.55 27.16 9.79 8.46 1.57 1.35
21.6 2 7 144.66 172.33 30.73 49.19 21.24 28.54 40.22 16.24 33.50 20.09 27.15 23.93 43.46 4671.02 30.97 12.36 7.99 1.98 1.2
21.6 3 7 145.04 137.43 30.79 50.47 21.23 36.72 39.80 16.76 30.34 20.14 27.20 19.09 44.59 5471.57 26.51 12.26 8.46 1.96 1.3
21.6 4 7 143.71 133.07 32.57 48.72 22.67 36.62 38.61 17.46 31.63 19.96 28.78 18.48 43.05 5122.61 28.05 12.58 8.51 2.01 1.3
21.6 5 7 138.66 156.67 29.52 52.54 21.29 33.53 40.08 16.85 34.33 19.26 26.08 21.76 46.42 5088.69 27.25 11.83 8.85 1.89 1.4
21.6 6 7 119.38 147.68 26.05 54.34 21.82 36.80 37.52 17.09 34.01 16.58 23.02 20.51 48.01 5801.87 20.58 9.77 9.29 1.56 1.49
19.01 1 7 131.20 135.47 28.84 54.23 21.98 40.03 39.08 15.48 31.37 18.22 24.93 18.82 46.87 6586.24 19.92 11.27 8.39 1.80 1
19.01 2 7 134.44 144.53 31.11 50.98 23.14 35.27 32.92 15.05 33.11 18.67 26.88 20.07 44.06 6454.19 20.83 10.24 7.67 1.64 1
19.01 3 7 128.02 139.35 29.27 54.82 22.87 39.34 37.65 15.30 32.40 17.78 25.30 19.35 47.38 5888.92 21.74 11.02 8.39 1.76 1
19.01 4 7 155.24 108.54 33.91 56.24 21.85 51.81 37.30 15.45 30.75 21.56 29.31 15.08 48.60 8840.48 17.56 12.65 8.69 2.02 1
19.01 5 7 122.99 133.08 27.79 52.63 22.59 39.55 38.26 15.50 32.47 17.08 24.02 18.48 45.48 5264.16 23.36 10.63 8.16 1.70 1
19.01 6 7 117.83 141.43 26.94 56.77 22.86 40.14 38.79 15.58 32.06 16.37 23.28 19.64 49.06 5019.98 23.47 10.45 8.84 1.67 1
15.37 1 7 100.16 182.36 19.58 64.53 19.55 35.39 37.25 12.36 30.39 13.91 16.88 25.33 55.63 5348.54 18.73 7.29 7.98 1.17 1.2
15.37 2 7 102.87 169.69 21.79 62.93 21.18 37.08 37.71 12.22 28.88 14.29 18.78 23.57 54.25 6083.28 16.91 8.22 7.69 1.31 1.2
15.37 3 7 98.64 154.55 20.99 62.53 21.28 40.46 38.31 12.35 29.05 13.70 18.10 21.47 53.91 4989.13 19.77 8.04 7.72 1.29 1.24
15.37 4 7 108.93 166.15 22.80 62.94 20.93 37.88 39.92 11.46 27.14 15.13 19.66 23.08 54.26 5532.27 19.69 9.10 7.21 1.46 1.1
15.37 5 7 101.44 175.07 21.76 65.89 21.45 37.63 37.93 12.36 29.02 14.09 18.76 24.32 56.80 5617.91 18.06 8.25 8.14 1.32 1.3
15.37 6 7 100.79 162.98 21.72 67.15 21.55 41.20 37.58 12.85 29.98 14.00 18.73 22.64 57.89 4568.89 22.06 8.16 8.63 1.31 1.3
13.42 1 7 86.50 178.94 19.11 71.32 22.10 39.86 34.50 10.51 27.84 12.01 15.74 24.85 58.72 5217.46 16.58 6.60 7.50 1.06 1.20
13.42 2 7 91.58 200.81 18.46 73.52 20.16 36.61 35.37 9.46 25.67 12.72 15.20 27.89 60.53 5235.75 17.49 6.53 6.95 1.04 1.11
13.42 3 7 85.70 163.21 17.38 71.28 20.28 43.67 34.27 9.62 24.74 11.90 14.31 22.67 58.69 5107.72 16.78 5.96 6.86 0.95 1.10
13.42 4 7 92.81 178.91 19.68 69.76 21.21 38.99 34.77 9.80 24.01 12.89 16.20 24.85 57.43 5953.15 15.59 6.84 6.83 1.09 1.09
13.42 5 7 90.93 183.64 19.46 71.52 21.40 38.95 33.77 9.99 22.60 12.63 16.02 25.51 58.88 5947.51 15.29 6.57 7.14 1.05 1.14
13.42 6 7 80.15 173.28 16.72 73.77 20.86 42.57 32.99 10.02 24.21 11.13 13.77 24.07 60.74 4905.18 16.34 5.52 7.39 0.88 1.18
6.03 1 7 37.48 244.97 7.94 100.33 21.19 40.96 31.83 5.45 18.12 5.21 6.10 34.02 77.12 3979.91 9.42 2.53 5.47 0.40 0.87 -1.9
6.03 2 7 41.04 166.59 9.05 102.45 22.05 61.50 32.21 5.51 18.81 5.70 6.96 23.14 78.74 4418.45 9.29 2.91 5.65 0.47 0.90 -9.2
6.03 3 7 29.90 245.75 6.18 106.32 20.67 43.26 27.83 5.48 16.72 4.15 4.75 34.13 81.72 3982.68 7.51 1.72 5.83 0.28 0.93 3.75
6.03 4 7 41.77 241.64 9.01 97.16 21.57 40.21 30.34 5.41 18.00 5.80 6.93 33.56 74.68 4243.70 9.84 2.73 5.25 0.44 0.84 -1.96
6.03 5 7 38.78 262.63 7.59 100.80 19.57 38.38 31.05 5.43 16.78 5.39 5.83 36.48 77.47 4213.23 9.20 2.36 5.47 0.38 0.88 0.13
6.03 6 7 37.14 262.38 7.62 102.71 20.52 39.14 33.76 5.57 19.50 5.16 5.86 36.44 78.94 4070.54 9.12 2.57 5.72 0.41 0.91 -5.7
21.6 1 8 106.91 69.13 25.98 49.90 24.30 72.18 41.46 16.54 27.89 14.85 22.96 9.60 44.09 5537.17 19.31 10.77 8.25 1.72 1.32
21.6 2 8 116.14 77.36 29.34 46.81 25.26 60.51 34.17 18.09 30.47 16.13 25.92 10.74 41.36 5783.96 20.08 10.03 8.47 1.60 1.35
21.6 3 8 111.68 75.07 29.10 48.90 26.06 65.14 38.90 18.12 29.97 15.51 25.71 10.43 43.21 4640.38 24.07 11.32 8.86 1.81 1.42
21.6 4 8 106.16 68.95 27.21 49.36 25.64 71.58 39.93 17.84 31.16 14.74 24.04 9.58 43.61 5813.52 18.26 10.87 8.81 1.30 1.41
21.6 5 8 114.70 73.15 29.34 47.12 25.58 64.42 39.67 16.89 30.08 15.93 25.92 10.16 41.63 4828.28 23.76 11.64 7.96 1.14 1.27
21.6 6 8 90.43 72.56 23.83 52.54 26.35 72.40 36.47 16.67 31.70 12.56 21.05 10.08 46.42 4906.50 18.43 8.69 8.76 1.39 1.40 2
19.01 1 8 83.06 89.81 20.04 61.48 24.13 68.45 42.20 16.21 30.16 11.54 17.32 12.47 53.13 4687.54 17.72 8.46 9.97 1.35 1.59
19.01 2 8 109.65 84.40 28.04 49.35 25.57 58.47 40.40 16.39 30.23 15.23 24.24 11.72 42.65 4495.65 24.39 11.33 8.09 1.81 1.2
19.01 3 8 93.30 86.47 24.73 57.51 26.50 66.51 40.56 16.22 32.03 12.96 21.37 12.01 49.70 4314.66 21.62 10.03 9.33 1.60 1.49
19.01 4 8 87.53 92.79 23.40 60.01 26.73 64.67 40.44 16.12 30.21 12.16 20.22 12.89 51.86 4210.53 20.79 9.46 9.68 1.51 1.55
19.01 5 8 98.84 86.60 25.48 56.01 25.78 64.68 39.93 16.32 30.96 13.73 22.02 12.03 48.41 5021.07 19.69 10.17 9.14 1.63 1.46
19.01 6 8 88.87 85.33 22.20 61.49 24.98 72.06 40.30 15.18 31.08 12.34 19.19 11.85 53.14 5095.92 17.44 8.95 9.33 1.43 1.49
15.37 1 8 85.52 96.90 21.00 54.16 24.56 55.89 39.32 13.96 29.67 11.88 18.11 13.46 46.69 5097.33 16.78 8.26 7.56 1.32 1.21
15.37 2 8 92.55 100.08 24.04 55.54 25.97 55.49 39.33 12.97 30.60 12.85 20.73 13.90 47.88 5186.47 17.84 9.46 7.20 1.51 1.15
15.37 3 8 89.02 96.13 22.77 59.13 25.58 61.51 39.64 12.04 31.15 12.36 19.63 13.35 50.98 4801.47 18.54 9.03 7.12 1.44 1.14
15.37 4 8 73.56 98.84 18.71 65.83 25.43 66.60 39.52 12.69 28.78 10.22 16.13 13.73 56.76 4991.05 14.74 7.39 8.35 1.18 1.34
15.37 5 8 85.81 99.34 18.93 58.34 22.06 58.72 38.63 12.71 29.74 11.92 16.32 13.80 50.29 4746.58 18.08 7.31 7.42 1.17 1.19
15.37 6 8 84.53 100.41 17.52 61.11 20.73 60.86 38.97 12.42 29.03 11.74 15.11 13.95 52.68 5098.37 16.58 6.83 7.59 1.09 1.21
13.42 1 8 74.95 128.52 17.91 68.84 23.90 53.56 37.34 9.99 28.87 10.41 14.75 17.85 56.67 5546.89 13.51 6.69 6.88 1.07 1.10
13.42 2 8 69.54 120.57 17.87 71.57 25.70 59.36 37.86 9.88 28.06 9.66 14.71 16.75 58.93 6025.88 11.54 6.77 7.07 1.08 1.13 1
13.42 3 8 67.38 123.44 15.86 71.20 23.54 57.68 38.43 9.72 28.76 9.36 13.06 17.14 58.62 4882.02 13.80 6.09 6.92 0.98 1.11 2
13.42 4 8 70.93 122.39 18.00 70.33 25.38 57.46 39.11 18.34 30.21 9.85 14.82 17.00 57.90 5046.40 14.06 7.04 12.90 1.13 2.06
13.42 5 8 72.72 127.39 16.51 69.91 22.70 54.88 38.04 10.02 28.70 10.10 13.59 17.69 57.56 5594.96 13.00 6.28 7.01 1.00 1.12
13.42 6 8 66.03 119.55 17.04 73.39 25.81 61.39 40.33 11.29 30.33 9.17 14.03 16.60 60.42 4573.34 14.44 6.87 8.28 1.10 0.05
6.03 1 8 37.81 210.59 8.94 98.14 23.64 46.60 30.76 5.40 23.91 5.25 6.87 29.25 75.43 4354.56 8.68 2.75 5.30 0.44 0.85 -2.68
6.03 2 8 23.97 202.14 5.36 108.45 22.37 53.65 32.47 6.47 15.89 3.33 4.12 28.08 83.35 3934.52 6.09 1.74 7.01 0.28 1.12 -11
6.03 3 8 37.51 221.19 9.49 97.68 25.29 44.16 31.43 5.23 22.55 5.21 7.29 30.72 75.08 4204.99 8.92 2.98 5.11 0.48 0.82 -3.16
6.03 4 8 37.25 204.72 9.24 96.99 24.81 47.38 31.46 5.61 22.93 5.17 7.10 28.43 74.55 4713.87 7.90 2.91 5.44 0.47 0.87 -6.47
6.03 5 8 41.80 217.54 10.28 95.65 24.59 43.97 29.38 6.06 20.28 5.81 7.90 30.21 73.51 4569.03 9.15 3.02 5.80 0.48 0.93 -12
6.03 6 8 36.84 217.80 9.36 101.76 25.41 46.72 31.54 11.93 21.56 5.12 7.19 30.25 78.21 4862.88 7.58 2.95 12.14 0.47 1.94 -9
21.6 1 9 82.20 72.02 22.17 58.07 26.97 80.63 42.35 16.92 25.65 11.42 19.59 10.00 51.31 3678.65 22.35 9.39 9.83 1.50 1.57 2
21.6 2 9 98.05 65.25 27.24 52.27 27.78 80.10 42.60 17.19 28.72 13.62 24.07 9.06 46.18 5431.97 18.05 11.60 8.99 1.86 1.44 1
21.6 3 9 100.06 63.60 27.44 51.27 27.43 80.61 41.03 17.52 29.12 13.90 24.25 8.83 45.30 5589.83 17.90 11.26 8.98 1.80 1.44
21.6 4 9 93.31 67.75 27.13 53.84 29.08 79.47 41.46 17.23 30.06 12.96 23.97 9.41 47.57 4292.26 21.74 11.25 9.28 1.80 1.48 1
21.6 5 9 97.76 62.14 26.62 49.80 27.23 80.15 39.84 17.82 29.59 13.58 23.52 8.63 44.00 5159.56 18.95 10.61 8.88 1.70 1.42 2
21.6 6 9 87.18 60.59 25.65 49.64 29.42 81.93 39.71 16.38 30.82 12.11 22.66 8.42 43.86 4826.04 18.06 10.19 8.13 1.63 1.30 2
19.01 1 9 93.71 67.39 21.58 53.91 23.03 80.00 39.94 16.04 29.22 13.02 18.65 9.36 46.60 4685.50 20.00 8.62 8.65 1.38 1.38 2
19.01 2 9 82.63 72.91 21.41 59.51 25.91 81.63 41.63 10.17 28.22 11.48 18.51 10.13 51.44 4588.74 18.01 8.91 6.05 1.43 0.97
19.01 3 9 94.31 68.19 25.78 53.86 27.34 78.98 40.89 16.77 29.99 13.10 22.28 9.47 46.55 4575.44 20.61 10.54 9.03 1.69 1.45
19.01 4 9 86.14 69.66 23.11 56.40 26.82 80.96 39.61 15.45 27.66 11.96 19.97 9.68 48.74 4865.79 17.70 9.15 8.71 1.46 1.39 1
19.01 5 9 85.41 71.32 24.35 58.17 28.51 81.56 38.08 15.64 30.17 11.86 21.05 9.91 50.27 4474.67 19.09 9.27 9.09 1.48 1.46 1
19.01 6 9 93.03 66.12 25.65 54.08 27.57 81.79 37.52 15.79 29.84 12.92 22.17 9.18 46.74 4957.89 18.76 9.62 8.54 1.54 1.37 1
15.37 1 9 81.56 73.48 17.12 57.80 20.99 78.65 36.61 13.42 28.81 11.33 14.76 10.21 49.83 4828.35 16.89 6.27 7.75 1.00 1.24
15.37 2 9 78.63 75.98 18.88 60.29 24.01 79.35 37.22 14.67 28.19 10.92 16.27 10.55 51.98 4730.33 16.62 7.03 8.84 1.12 1.42
15.37 3 9 88.13 73.55 22.93 55.40 26.01 75.32 36.45 13.29 28.95 12.24 19.76 10.22 47.76 4878.63 18.06 8.36 7.37 1.34 1.18
15.37 4 9 83.78 73.31 21.59 59.22 25.77 80.79 37.99 11.94 30.14 11.64 18.61 10.18 51.06 3930.83 21.31 8.20 7.07 1.31 1.13
15.37 5 9 86.33 77.15 22.79 59.42 26.40 77.02 37.11 11.95 28.08 11.99 19.65 10.72 51.23 4307.88 20.04 8.46 7.10 1.35 1.14
```

```
15.37 6 9 88.92 62.92 24.34 60.54 27.37 96.22 37.60 11.33 27.99 12.35 20.98 8.74 52.20 4578.58 19.42 9.15 6.86 1.46 1.10 1
13.42 1 9 69.46 92.38 16.47 67.45 23.72 73.01 38.00 5.60 30.16 9.65 13.56 12.83 55.53 4737.17 14.66 6.26 3.78 1.00 0.60 38
13.42 2 9 68.99 95.08 16.95 66.59 24.57 70.03 37.68 7.17 29.75 9.58 13.95 13.21 54.82 5050.07 13.66 6.39 4.78 1.02 0.76 31
13.42 3 9 71.34 95.33 17.81 66.94 24.97 70.21 37.02 9.96 29.81 9.91 14.67 13.24 55.11 4869.92 14.65 6.59 6.67 1.06 1.07 18
13.42 4 9 65.34 96.10 16.37 73.77 25.05 76.76 36.73 9.32 29.06 9.08 13.48 13.35 60.73 4968.97 13.15 6.01 6.88 0.96 1.10 26
13.42 5 9 75.29 96.86 17.95 65.12 23.85 67.23 37.84 9.79 28.61 10.46 14.78 13.45 53.61 5575.37 13.50 6.79 6.38 1.09 1.02 1
13.42 6 9 75.09 87.85 18.94 63.12 25.22 71.84 35.13 10.67 29.07 10.43 15.59 12.20 51.96 4460.35 16.84 6.65 6.73 1.06 1.08
6.03 1 9 33.44 168.40 7.10 97.41 21.24 57.84 26.66 5.48 26.85 4.64 5.46 23.39 74.87 4454.21 7.51 1.89 5.34 0.30 0.85 7.75
6.03 2 9 34.28 175.74 7.22 95.82 21.05 54.53 29.92 5.87 31.89 4.76 5.55 24.41 73.65 3297.74 10.40 2.16 5.63 0.35 0.90 0.66
6.03 3 9 50.06 190.92 10.60 90.00 21.17 47.14 25.35 6.43 27.22 6.95 8.15 26.52 69.18 3776.98 13.25 2.69 5.78 0.43 0.93 -8
6.03 4 9 39.92 185.76 9.98 92.07 25.00 49.56 31.49 5.44 34.33 5.54 7.67 25.80 70.77 4207.57 9.49 3.14 5.01 0.50 0.80 -3.99
6.03 5 9 41.73 188.49 10.32 94.74 24.72 50.26 29.33 5.79 31.08 5.80 7.93 26.18 72.82 4356.61 9.58 3.03 5.48 0.48 0.88 -8.5
6.03 6 9 43.47 175.15 10.52 87.44 24.21 49.92 30.54 5.49 33.51 6.04 8.09 24.33 67.21 4338.31 10.02 3.21 4.80 0.51 0.77 -2
21.6 1 10 105.29 51.26 29.25 39.81 27.78 77.67 38.27 19.06 26.67 14.62 25.85 7.12 35.17 5317.04 19.80 11.19 7.59 1.79 1.21
21.6 2 10 108.56 51.27 27.17 31.40 25.03 61.24 37.63 18.20 27.33 15.08 24.01 7.12 27.74 5341.84 20.32 10.23 5.71 1.64 0.91
21.6 3 10 86.16 64.26 28.33 50.23 32.88 78.16 40.07 18.23 32.39 11.97 25.03 8.93 44.38 2803.21 30.74 11.35 9.16 1.82 1.47
21.6 4 10 95.71 57.78 26.52 46.55 27.71 80.57 39.19 16.63 27.63 13.29 23.43 8.03 41.13 5080.43 18.84 10.39 7.74 1.66 1.24
21.6 5 10 98.02 58.27 29.02 45.46 29.60 78.02 39.00 16.88 31.32 13.61 25.64 8.09 40.17 4539.05 21.59 11.32 7.67 1.81 1.23
21.6 6 10 82.49 61.85 25.76 47.65 31.23 77.04 39.16 17.48 33.46 11.46 22.76 8.59 42.10 4338.12 19.02 10.09 8.33 1.61 1.33
19.01 1 10 79.25 69.54 23.81 56.55 30.04 81.32 40.97 16.59 30.92 11.01 20.58 9.66 48.88 5017.60 15.79 9.75 9.38 1.56 1.50
19.01 2 10 87.69 64.51 24.02 52.13 27.40 80.80 40.31 16.50 39.57 12.18 20.76 8.96 45.05 4507.27 19.46 9.68 8.60 1.55 1.38
19.01 3 10 87.30 65.80 25.49 52.14 29.20 79.24 39.43 10.14 36.77 12.13 22.03 9.14 45.07 5258.83 16.60 10.05 5.29 1.61 0.85
19.01 4 10 84.17 67.22 24.54 54.05 29.15 80.41 40.12 16.76 37.77 11.69 21.21 9.34 46.71 5157.72 16.32 9.85 9.06 1.58 1.45
19.01 5 10 82.10 67.40 25.47 54.14 31.03 80.33 39.19 17.45 40.27 11.40 22.01 9.36 46.80 4958.51 16.56 9.98 9.45 1.60 1.51
19.01 6 10 85.67 67.44 24.99 54.70 29.17 81.11 38.94 16.90 37.77 11.90 21.60 9.37 47.28 5473.36 15.65 9.73 9.24 1.56 1.48
15.37 1 10 79.52 69.10 21.82 55.23 27.44 79.92 39.05 14.18 37.88 11.04 18.81 9.60 47.61 4377.54 18.17 8.52 7.83 1.36 1.25
15.37 2 10 78.82 70.19 22.16 56.79 28.11 80.91 41.25 11.52 37.60 10.95 19.10 9.75 48.96 4277.90 18.42 9.14 6.54 1.46 1.05
15.37 3 10 79.08 72.59 21.66 58.37 27.38 80.42 39.66 13.55 36.88 10.98 18.67 10.08 50.33 4609.05 17.16 8.59 7.91 1.37 1.27
15.37 4 10 78.60 69.89 22.31 56.85 28.38 81.34 38.72 12.49 28.89 10.92 19.23 9.71 49.01 3656.54 21.50 8.64 7.10 1.38 1.14
15.37 5 10 76.45 72.73 20.98 58.53 27.44 80.48 39.61 13.47 28.02 10.62 18.08 10.10 50.46 4883.03 15.66 8.31 7.88 1.33 1.26
15.37 6 10 79.81 70.77 21.51 56.77 26.95 80.22 38.94 16.00 27.66 11.08 18.55 9.83 48.95 4810.68 16.59 8.38 9.09 1.34 1.45
13.42 1 10 71.27 85.09 17.69 64.37 24.82 75.65 36.73 10.63 28.32 9.90 14.56 11.82 53.00 4826.60 14.77 6.50 6.84 1.04 1.10
13.42 2 10 72.51 80.40 18.98 63.41 26.18 78.86 36.90 10.06 29.32 10.07 15.63 11.17 52.20 3870.08 18.74 7.00 6.38 1.12 1.02
13.42 3 10 69.87 83.87 17.40 64.96 24.90 77.46 39.49 10.00 30.07 9.70 14.32 11.65 53.48 4022.40 17.37 6.87 6.50 1.10 1.04
13.42 4 10 71.25 85.09 18.29 64.52 25.67 75.83 38.62 9.86 29.06 9.90 15.06 11.82 53.12 4754.73 14.99 7.06 6.36 1.13 1.02 1
13.42 5 10 74.39 88.26 18.90 63.60 25.41 72.06 37.17 10.01 29.46 10.33 15.56 12.26 52.36 5053.19 14.72 7.03 6.37 1.12 1.02
13.42 6 10 66.39 79.97 16.97 62.99 25.57 78.77 36.03 9.84 29.33 9.22 13.97 11.11 51.86 3538.15 18.76 6.11 6.20 0.98 0.99 2
6.03 1 10 30.59 170.85 7.52 96.86 24.58 56.69 36.89 5.65 30.93 4.25 5.78 23.73 74.45 3022.37 10.12 2.77 5.47 0.44 0.88 -5
6.03 2 10 30.77 165.89 7.83 95.46 25.45 57.54 35.49 5.80 31.74 4.27 6.02 23.04 73.37 3948.31 7.79 2.78 5.53 0.44 0.89 -6.6
6.03 3 10 27.12 172.66 7.17 95.71 26.44 55.43 33.59 5.91 31.70 3.77 5.51 23.98 73.56 3919.14 6.92 2.41 5.65 0.39 0.90 -2.8
6.03 4 10 36.75 166.07 9.57 91.64 26.05 55.18 31.14 5.93 34.00 5.10 7.36 23.07 70.43 4282.62 8.58 2.98 5.43 0.48 0.87 -7.3
6.03 5 10 25.53 163.27 6.37 99.58 24.94 60.99 36.88 6.08 27.98 3.55 4.89 22.68 76.54 3516.11 7.26 2.35 6.06 0.38 0.97 -7.2
6.03 6 10 36.84 173.65 9.54 92.03 25.89 53.00 32.29 6.23 36.07 5.12 7.33 24.12 70.73 4232.21 8.70 3.08 5.73 0.49 0.92 -12
;
run;
```

```
proc iml;
   levels = {6.03, 13.42, 15.37, 19.01, 21.6};
   orth_poly = orpol(levels, 2);
   print orth_poly;
quit;
```

```
proc iml;
   levels = {7, 8, 9, 10};
   orth_poly = orpol(levels, 2);
   print orth_poly;
quit;
```

```
proc mixed data=nicolas3;
title 'MLMN';
class nivel_PB dias;
model MLMN = nivel_PB|dias;* / influence;*;
repeated dias / subject=rep type=vc group=nivel_pb;
lsmeans nivel_PB*dias;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 7" -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 8" 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 9" 0 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 10" 0 0 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 7"  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 8" 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 9" 0 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 10" 0 0 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481;
lsmeans nivel_PB;
lsmestimate nivel_PB "linear nivel_PB" -0.758104 -0.139466 0.0237744 0.3284892 0.5453055;
lsmestimate nivel_PB "quadr nivel_PB" 0.4623364 -0.515178 -0.466043 -0.031263 0.5501481;
lsmeans dias;
lsmestimate dias "linear dias" -0.67082 -0.223607 0.2236068 0.6708204;
lsmestimate dias "quadr dias" 0.5 -0.5 -0.5 0.5;
run;
```

```
proc mixed data=nicolas3;
```

```
title 'MFMN';
class nivel_PB dias;
model MFMN = nivel_PB|dias;* / influence;*;
repeated dias / subject=rep type=vc group=nivel_pb;
lsmeans nivel_PB*dias;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 7" -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 8" 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 9" 0 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 10" 0 0 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 7"  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 8" 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 9" 0 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 10" 0 0 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481;
lsmeans nivel_PB;
lsmestimate nivel_PB "linear nivel_PB" -0.758104 -0.139466 0.0237744 0.3284892 0.5453055;
lsmestimate nivel_PB "quadr nivel_PB" 0.4623364 -0.515178 -0.466043 -0.031263 0.5501481;
lsmeans dias;
lsmestimate dias "linear dias" -0.67082 -0.223607 0.2236068 0.6708204;
lsmestimate dias "quadr dias" 0.5 -0.5 -0.5 0.5;
run;

proc mixed data=nicolas3;
title 'MLMS';
class nivel_PB dias;
model MLMS = nivel_PB|dias;* / influence;*;
repeated dias / subject=rep type=vc group=nivel_pb;
lsmeans nivel_PB*dias;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 7" -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 8" 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 9" 0 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 10" 0 0 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 7"  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 8" 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 9" 0 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 10" 0 0 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481;
lsmeans nivel_PB;
lsmestimate nivel_PB "linear nivel_PB" -0.758104 -0.139466 0.0237744 0.3284892 0.5453055;
lsmestimate nivel_PB "quadr nivel_PB" 0.4623364 -0.515178 -0.466043 -0.031263 0.5501481;
lsmeans dias;
lsmestimate dias "linear dias" -0.67082 -0.223607 0.2236068 0.6708204;
lsmestimate dias "quadr dias" 0.5 -0.5 -0.5 0.5;
run;

proc mixed data=nicolas3;
title 'MFMS';
class nivel_PB dias;
model MFMS = nivel_PB|dias;* / influence;*;
repeated dias / subject=rep type=vc group=nivel_pb;
lsmeans nivel_PB*dias;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 7" -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 8" 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 9" 0 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 10" 0 0 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 7"  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 8" 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 9" 0 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 10" 0 0 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481;
lsmeans nivel_PB;
lsmestimate nivel_PB "linear nivel_PB" -0.758104 -0.139466 0.0237744 0.3284892 0.5453055;
lsmestimate nivel_PB "quadr nivel_PB" 0.4623364 -0.515178 -0.466043 -0.031263 0.5501481;
lsmeans dias;
lsmestimate dias "linear dias" -0.67082 -0.223607 0.2236068 0.6708204;
lsmestimate dias "quadr dias" 0.5 -0.5 -0.5 0.5;
run;

proc mixed data=nicolas3;
title 'MSL';
class nivel_PB dias;
model MSL = nivel_PB|dias;* / influence;*;
repeated dias / subject=rep type=vc group=nivel_pb;
lsmeans nivel_PB*dias;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 7" -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 8" 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 9" 0 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 10" 0 0 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 7"  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 8" 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 9" 0 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 10" 0 0 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481;
lsmeans nivel_PB;
lsmestimate nivel_PB "linear nivel_PB" -0.758104 -0.139466 0.0237744 0.3284892 0.5453055;
lsmestimate nivel_PB "quadr nivel_PB" 0.4623364 -0.515178 -0.466043 -0.031263 0.5501481;
```

```
lsmeans dias;
lsmestimate dias "linear dias" -0.67082 -0.223607 0.2236068 0.6708204;
lsmestimate dias "quadr dias" 0.5 -0.5 -0.5 0.5;
run;

proc mixed data=nicolas3;
title 'MSF';
class nivel_PB dias;
model MSF = nivel_PB|dias;* / influence;*;
repeated dias / subject=rep type=vc group=nivel_pb;
lsmeans nivel_PB*dias;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 7" -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 8" 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 9" 0 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 10" 0 0 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 7"  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 8" 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 9" 0 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 10" 0 0 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481;
lsmeans nivel_PB;
lsmestimate nivel_PB "linear nivel_PB" -0.758104 -0.139466 0.0237744 0.3284892 0.5453055;
lsmestimate nivel_PB "quadr nivel_PB" 0.4623364 -0.515178 -0.466043 -0.031263 0.5501481;
lsmeans dias;
lsmestimate dias "linear dias" -0.67082 -0.223607 0.2236068 0.6708204;
lsmestimate dias "quadr dias" 0.5 -0.5 -0.5 0.5;
run;

proc mixed data=nicolas3;
title 'PBL';
class nivel_PB dias;
model PBL = nivel_PB|dias;* / influence;*;
repeated dias / subject=rep type=vc group=nivel_pb;
lsmeans nivel_PB*dias;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 7" -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 8" 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 9" 0 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 10" 0 0 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 7"  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 8" 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 9" 0 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 10" 0 0 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481;
lsmeans nivel_PB;
lsmestimate nivel_PB "linear nivel_PB" -0.758104 -0.139466 0.0237744 0.3284892 0.5453055;
lsmestimate nivel_PB "quadr nivel_PB" 0.4623364 -0.515178 -0.466043 -0.031263 0.5501481;
lsmeans dias;
lsmestimate dias "linear dias" -0.67082 -0.223607 0.2236068 0.6708204;
lsmestimate dias "quadr dias" 0.5 -0.5 -0.5 0.5;
run;

proc mixed data=nicolas3;
title 'PBF';
class nivel_PB dias;
model PBF = nivel_PB|dias;* / influence;*;
repeated dias / subject=rep type=vc group=nivel_pb;
lsmeans nivel_PB*dias;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 7" -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 8" 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 9" 0 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 10" 0 0 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 7"  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 8" 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 9" 0 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 10" 0 0 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481;
lsmeans nivel_PB;
lsmestimate nivel_PB "linear nivel_PB" -0.758104 -0.139466 0.0237744 0.3284892 0.5453055;
lsmestimate nivel_PB "quadr nivel_PB" 0.4623364 -0.515178 -0.466043 -0.031263 0.5501481;
lsmeans dias;
lsmestimate dias "linear dias" -0.67082 -0.223607 0.2236068 0.6708204;
lsmestimate dias "quadr dias" 0.5 -0.5 -0.5 0.5;
run;

proc mixed data=nicolas3;
title 'EEL';
class nivel_PB dias;
model EEL = nivel_PB|dias;* / influence;*;
repeated dias / subject=rep type=vc group=nivel_pb;
lsmeans nivel_PB*dias;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 7" -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 8" 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 9" 0 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 10" 0 0 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 7"  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0 0 0;
```

```
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 8" 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 9" 0 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 10" 0 0 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481;
lsmeans nivel_PB;
lsmestimate nivel_PB "linear nivel_PB" -0.758104 -0.139466 0.0237744 0.3284892 0.5453055;
lsmestimate nivel_PB "quadr nivel_PB" 0.4623364 -0.515178 -0.466043 -0.031263 0.5501481;
lsmeans dias;
lsmestimate dias "linear dias" -0.67082 -0.223607 0.2236068 0.6708204;
lsmestimate dias "quadr dias" 0.5 -0.5 -0.5 0.5;
run;
```

```
proc mixed data=nicolas3;
title 'BCLMN';
class nivel_PB dias;
model BCLMN = nivel_PB|dias;* / influence;*;
repeated dias / subject=rep type=vc group=nivel_pb;
lsmeans nivel_PB*dias;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 7" -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 8" 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 9" 0 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 10" 0 0 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 7"  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 8" 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 9" 0 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 10" 0 0 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481;
lsmeans nivel_PB;
lsmestimate nivel_PB "linear nivel_PB" -0.758104 -0.139466 0.0237744 0.3284892 0.5453055;
lsmestimate nivel_PB "quadr nivel_PB" 0.4623364 -0.515178 -0.466043 -0.031263 0.5501481;
lsmeans dias;
lsmestimate dias "linear dias" -0.67082 -0.223607 0.2236068 0.6708204;
lsmestimate dias "quadr dias" 0.5 -0.5 -0.5 0.5;
run;
```

```
proc mixed data=nicolas3;
title 'BCLMS';
class nivel_PB dias;
model BCLMS = nivel_PB|dias;* / influence;*;
repeated dias / subject=rep type=vc group=nivel_pb;
lsmeans nivel_PB*dias;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 7" -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 8" 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 9" 0 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 10" 0 0 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 7"  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 8" 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 9" 0 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 10" 0 0 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481;
lsmeans nivel_PB;
lsmestimate nivel_PB "linear nivel_PB" -0.758104 -0.139466 0.0237744 0.3284892 0.5453055;
lsmestimate nivel_PB "quadr nivel_PB" 0.4623364 -0.515178 -0.466043 -0.031263 0.5501481;
lsmeans dias;
lsmestimate dias "linear dias" -0.67082 -0.223607 0.2236068 0.6708204;
lsmestimate dias "quadr dias" 0.5 -0.5 -0.5 0.5;
run;
```

```
proc mixed data=nicolas3;
title 'BCFMN';
class nivel_PB dias;
model BCFMN = nivel_PB|dias;* / influence;*;
repeated dias / subject=rep type=vc group=nivel_pb;
lsmeans nivel_PB*dias;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 7" -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 8" 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 9" 0 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 10" 0 0 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 7"  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 8" 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 9" 0 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 10" 0 0 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481;
lsmeans nivel_PB;
lsmestimate nivel_PB "linear nivel_PB" -0.758104 -0.139466 0.0237744 0.3284892 0.5453055;
lsmestimate nivel_PB "quadr nivel_PB" 0.4623364 -0.515178 -0.466043 -0.031263 0.5501481;
lsmeans dias;
lsmestimate dias "linear dias" -0.67082 -0.223607 0.2236068 0.6708204;
lsmestimate dias "quadr dias" 0.5 -0.5 -0.5 0.5;
run;
```

```
proc mixed data=nicolas3;
title 'BCFMS';
class nivel_PB dias;
model BCFMS = nivel_PB|dias;* / influence;*;
repeated dias / subject=rep type=vc group=nivel_pb;
```

```
lsmeans nivel_PB*dias;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 7" -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 8" 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 9" 0 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 10" 0 0 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 7"  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 8" 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 9" 0 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 10" 0 0 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481;
lsmeans nivel_PB;
lsmestimate nivel_PB "linear nivel_PB" -0.758104 -0.139466 0.0237744 0.3284892 0.5453055;
lsmestimate nivel_PB "quadr nivel_PB" 0.4623364 -0.515178 -0.466043 -0.031263 0.5501481;
lsmeans dias;
lsmestimate dias "linear dias" -0.67082 -0.223607 0.2236068 0.6708204;
lsmestimate dias "quadr dias" 0.5 -0.5 -0.5 0.5;
run;
```

```
proc mixed data=nicolas3;
title 'Número Larval';
class nivel_PB dias;
model NLA = nivel_PB|dias;* / influence;*;
repeated dias / subject=rep type=vc group=nivel_pb;
lsmeans nivel_PB*dias;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 7" -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 8" 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 9" 0 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 10" 0 0 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 7"  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 8" 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 9" 0 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 10" 0 0 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481;
lsmeans nivel_PB;
lsmestimate nivel_PB "linear nivel_PB" -0.758104 -0.139466 0.0237744 0.3284892 0.5453055;
lsmestimate nivel_PB "quadr nivel_PB" 0.4623364 -0.515178 -0.466043 -0.031263 0.5501481;
lsmeans dias;
lsmestimate dias "linear dias" -0.67082 -0.223607 0.2236068 0.6708204;
lsmestimate dias "quadr dias" 0.5 -0.5 -0.5 0.5;
run;
```

```
proc mixed data=nicolas3;
title 'Peso médio larvalmg';
class nivel_PB dias;
model PMLmg = nivel_PB|dias;* / influence;*;
repeated dias / subject=rep type=vc group=nivel_pb;
lsmeans nivel_PB*dias;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 7" -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 8" 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 9" 0 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 10" 0 0 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 7"  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 8" 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 9" 0 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 10" 0 0 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481;
lsmeans nivel_PB;
lsmestimate nivel_PB "linear nivel_PB" -0.758104 -0.139466 0.0237744 0.3284892 0.5453055;
lsmestimate nivel_PB "quadr nivel_PB" 0.4623364 -0.515178 -0.466043 -0.031263 0.5501481;
lsmeans dias;
lsmestimate dias "linear dias" -0.67082 -0.223607 0.2236068 0.6708204;
lsmestimate dias "quadr dias" 0.5 -0.5 -0.5 0.5;
run;
```

```
proc mixed data=nicolas3;
title 'Nitrogênio larval g';
class nivel_PB dias;
model gNL = nivel_PB|dias;* / influence;*;
repeated dias / subject=rep type=vc group=nivel_pb;
lsmeans nivel_PB*dias;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 7" -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 8" 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 9" 0 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 10" 0 0 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 7"  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 8" 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 9" 0 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 10" 0 0 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481;
lsmeans nivel_PB;
lsmestimate nivel_PB "linear nivel_PB" -0.758104 -0.139466 0.0237744 0.3284892 0.5453055;
lsmestimate nivel_PB "quadr nivel_PB" 0.4623364 -0.515178 -0.466043 -0.031263 0.5501481;
lsmeans dias;
lsmestimate dias "linear dias" -0.67082 -0.223607 0.2236068 0.6708204;
lsmestimate dias "quadr dias" 0.5 -0.5 -0.5 0.5;
run;
```

```
proc mixed data=nicolas3;
title 'Nitrogênio do frass g';
class nivel_PB dias;
model gNF = nivel_PB|dias;* / influence;*;
repeated dias / subject=rep type=vc group=nivel_pb;
lsmeans nivel_PB*dias;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 7" -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 8" 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 9" 0 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 10" 0 0 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 7"  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 8" 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 9" 0 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 10" 0 0 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481;
lsmeans nivel_PB;
lsmestimate nivel_PB "linear nivel_PB" -0.758104 -0.139466 0.0237744 0.3284892 0.5453055;
lsmestimate nivel_PB "quadr nivel_PB" 0.4623364 -0.515178 -0.466043 -0.031263 0.5501481;
lsmeans dias;
lsmestimate dias "linear dias" -0.67082 -0.223607 0.2236068 0.6708204;
lsmestimate dias "quadr dias" 0.5 -0.5 -0.5 0.5;
run;
```

```
proc mixed data=nicolas3;
title 'Perda de N %';
class nivel_PB dias;
model PerdaNperc = nivel_PB|dias;* / influence;*;
repeated dias / subject=rep type=vc group=nivel_pb;
lsmeans nivel_PB*dias;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 7" -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 8" 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 9" 0 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 10" 0 0 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 7"  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 8" 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 9" 0 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 10" 0 0 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481;
lsmeans nivel_PB;
lsmestimate nivel_PB "linear nivel_PB" -0.758104 -0.139466 0.0237744 0.3284892 0.5453055;
lsmestimate nivel_PB "quadr nivel_PB" 0.4623364 -0.515178 -0.466043 -0.031263 0.5501481;
lsmeans dias;
lsmestimate dias "linear dias" -0.67082 -0.223607 0.2236068 0.6708204;
lsmestimate dias "quadr dias" 0.5 -0.5 -0.5 0.5;
run;
```

```
proc mixed data=nicolas3;
title 'EUNL';
class nivel_PB dias;
model EUNL = nivel_PB|dias;* / influence;*;
repeated dias / subject=rep type=vc group=nivel_pb;
lsmeans nivel_PB*dias;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 7" -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 8" 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 9" 0 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 10" 0 0 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 7"  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 8" 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 9" 0 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 10" 0 0 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481;
lsmeans nivel_PB;
lsmestimate nivel_PB "linear nivel_PB" -0.758104 -0.139466 0.0237744 0.3284892 0.5453055;
lsmestimate nivel_PB "quadr nivel_PB" 0.4623364 -0.515178 -0.466043 -0.031263 0.5501481;
lsmeans dias;
lsmestimate dias "linear dias" -0.67082 -0.223607 0.2236068 0.6708204;
lsmestimate dias "quadr dias" 0.5 -0.5 -0.5 0.5;
run;
```

```
proc mixed data=nicolas3;
title 'EUNF';
class nivel_PB dias;
model EUNF = nivel_PB|dias;* / influence;*;
repeated dias / subject=rep type=vc group=nivel_pb;
lsmeans nivel_PB*dias;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 7" -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 8" 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 9" 0 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 10" 0 0 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 7"  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0 0 0;
```

```
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 8" 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 9" 0 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 10" 0 0 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481;
lsmeans nivel_PB;
lsmestimate nivel_PB "linear nivel_PB" -0.758104 -0.139466 0.0237744 0.3284892 0.5453055;
lsmestimate nivel_PB "quadr nivel_PB" 0.4623364 -0.515178 -0.466043 -0.031263 0.5501481;
lsmeans dias;
lsmestimate dias "linear dias" -0.67082 -0.223607 0.2236068 0.6708204;
lsmestimate dias "quadr dias" 0.5 -0.5 -0.5 0.5;
run;
```

```
proc mixed data=nicolas3;
title 'DENSAR';
class nivel_PB dias;
model DENSAR = nivel_PB|dias;* / influence;*;
repeated dias / subject=rep type=vc group=nivel_pb;
lsmeans nivel_PB*dias;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 7" -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 8" 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 9" 0 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 10" 0 0 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 7"  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 8" 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 9" 0 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 10" 0 0 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481;
lsmeans nivel_PB;
lsmestimate nivel_PB "linear nivel_PB" -0.758104 -0.139466 0.0237744 0.3284892 0.5453055;
lsmestimate nivel_PB "quadr nivel_PB" 0.4623364 -0.515178 -0.466043 -0.031263 0.5501481;
lsmeans dias;
lsmestimate dias "linear dias" -0.67082 -0.223607 0.2236068 0.6708204;
lsmestimate dias "quadr dias" 0.5 -0.5 -0.5 0.5;
run;
```

```
proc mixed data=nicolas3;
title 'DENSVOL';
class nivel_PB dias;
model DENSVOL = nivel_PB|dias;* / influence;*;
repeated dias / subject=rep type=vc group=nivel_pb;
lsmeans nivel_PB*dias;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 7" -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 8" 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 9" 0 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "linear dia 10" 0 0 0 -0.758104 0 0 0 -0.139466 0 0 0 0.0237744 0 0 0 0.3284892 0 0 0 0.5453055;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 7"  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 8" 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 9" 0 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481 0;
lsmestimate nivel_PB*dias "quadr dia 10" 0 0 0  0.4623364 0 0 0 -0.515178 0 0 0 -0.466043 0 0 0 -0.031263 0 0 0 0.5501481;
lsmeans nivel_PB;
lsmestimate nivel_PB "linear nivel_PB" -0.758104 -0.139466 0.0237744 0.3284892 0.5453055;
lsmestimate nivel_PB "quadr nivel_PB" 0.4623364 -0.515178 -0.466043 -0.031263 0.5501481;
lsmeans dias;
```

orth_poly		
0.4472136	-0.758104	0.4623364
0.4472136	-0.139466	-0.515178
0.4472136	0.0237744	-0.466043
0.4472136	0.3284892	-0.031263
0.4472136	0.5453055	0.5501481

---

orth_poly		
0.5	-0.67082	0.5
0.5	-0.223607	-0.5
0.5	0.2236068	-0.5
0.5	0.6708204	0.5

MLMN

The Mixed Procedure

Model Information	
Data Set	WORK.NICOLAS3
Dependent Variable	MLMN
Covariance Structure	Variance Components
Subject Effect	Rep
Group Effect	Nivel_PB
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	None
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Between-Within

Class Level Information		
Class	Levels	Values
Nivel_PB	5	6.03 13.42 15.37 19.01 21.6
Dias	4	7 8 9 10

Dimensions	
Covariance Parameters	5
Columns in X	30
Columns in Z	0
Subjects	120
Max Obs per Subject	1

Number of Observations	
Number of Observations Read	120
Number of Observations Used	120
Number of Observations Not Used	0

Iteration History			
Iteration	Evaluations	-2 Res Log Like	Criterion
0	1	699.63135444	
1	1	673.07432436	0.00000000

Convergence criteria met.

Covariance Parameter Estimates			
Cov Parm	Subject	Group	Estimate
Dias	Rep	Nivel_PB 6.03	28.9346
Dias	Rep	Nivel_PB 13.42	13.9479
Dias	Rep	Nivel_PB 15.37	17.8468
Dias	Rep	Nivel_PB 19.01	73.9896
Dias	Rep	Nivel_PB 21.6	88.8059

Fit Statistics	
-2 Res Log Likelihood	673.1
AIC (Smaller is Better)	683.1
AICC (Smaller is Better)	683.7
BIC (Smaller is Better)	697.0

Null Model Likelihood Ratio Test		
DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
4	26.56	<.0001

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Nivel_PB	4	100	492.10	<.0001
Dias	3	100	104.31	<.0001
Nivel_PB*Dias	12	100	10.29	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 7	81.1814	2.9241	100	27.76	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 8	54.4784	2.9241	100	18.63	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 9	41.4962	2.9241	100	14.19	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 10	48.3560	2.9241	100	16.54	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 7	-2.5700	2.6049	100	-0.99	0.3262

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 8	-2.9951	2.6049	100	-1.15	0.2530

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 9	-8.8002	2.6049	100	-3.38	0.0010

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 10	-8.5804	2.6049	100	-3.29	0.0014

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB	linear nivel_PB	56.3780	1.4620	100	38.56	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB	quadr nivel_PB	-5.7364	1.3025	100	-4.40	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Dias	linear dias	-19.1617	1.2207	100	-15.70	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Dias	quadr dias	8.9977	1.2207	100	7.37	<.0001

Least Squares Means							
Effect	Nivel_PB	Dias	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	6.03	7	37.6850	2.1960	100	17.16	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	8	35.8633	2.1960	100	16.33	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	9	40.4833	2.1960	100	18.43	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	10	31.2667	2.1960	100	14.24	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	7	87.9450	1.5247	100	57.68	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	8	70.2583	1.5247	100	46.08	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	9	70.9183	1.5247	100	46.51	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	10	70.9467	1.5247	100	46.53	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	7	102.14	1.7247	100	59.22	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	8	85.1650	1.7247	100	49.38	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	9	84.5583	1.7247	100	49.03	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	10	78.7133	1.7247	100	45.64	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	7	131.62	3.5116	100	37.48	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	8	93.5417	3.5116	100	26.64	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	9	89.2050	3.5116	100	25.40	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	10	84.3633	3.5116	100	24.02	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	7	140.02	3.8472	100	36.39	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	8	107.67	3.8472	100	27.99	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	9	93.0933	3.8472	100	24.20	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	10	96.0383	3.8472	100	24.96	<.0001
Nivel_PB	6.03		36.3246	1.0980	100	33.08	<.0001
Nivel_PB	13.42		75.0171	0.7623	100	98.40	<.0001
Nivel_PB	15.37		87.6438	0.8623	100	101.64	<.0001
Nivel_PB	19.01		99.6825	1.7558	100	56.77	<.0001
Nivel_PB	21.6		109.20	1.9236	100	56.77	<.0001
Dias		7	99.8810	1.2207	100	81.82	<.0001
Dias		8	78.4997	1.2207	100	64.31	<.0001

Least Squares Means							
Effect	Nivel_PB	Dias	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Dias		9	75.6517	1.2207	100	61.97	<.0001
Dias		10	72.2657	1.2207	100	59.20	<.0001

MFMN

The Mixed Procedure

Model Information	
Data Set	WORK.NICOLAS3
Dependent Variable	MFMN
Covariance Structure	Variance Components
Subject Effect	Rep
Group Effect	Nivel_PB
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	None
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Between-Within

Class Level Information		
Class	Levels	Values
Nivel_PB	5	6.03 13.42 15.37 19.01 21.6
Dias	4	7 8 9 10

Dimensions	
Covariance Parameters	5
Columns in X	30
Columns in Z	0
Subjects	120
Max Obs per Subject	1

Number of Observations	
Number of Observations Read	120
Number of Observations Used	120
Number of Observations Not Used	0

Iteration History			
Iteration	Evaluations	-2 Res Log Like	Criterion
0	1	790.05898552	
1	1	744.15908619	0.00000000

Convergence criteria met.

Covariance Parameter Estimates			
Cov Parm	Subject	Group	Estimate
Dias	Rep	Nivel_PB 6.03	360.32
Dias	Rep	Nivel_PB 13.42	47.3232
Dias	Rep	Nivel_PB 15.37	31.0610
Dias	Rep	Nivel_PB 19.01	47.0852
Dias	Rep	Nivel_PB 21.6	66.3470

Fit Statistics

Fit Statistics	
-2 Res Log Likelihood	744.2
AIC (Smaller is Better)	754.2
AICC (Smaller is Better)	754.8
BIC (Smaller is Better)	768.1

Null Model Likelihood Ratio Test		
DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
4	45.90	<.0001

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Nivel_PB	4	100	243.65	<.0001
Dias	3	100	393.54	<.0001
Nivel_PB*Dias	12	100	7.26	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 7	-76.2873	6.2294	100	-12.25	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 8	-107.46	6.2294	100	-17.25	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 9	-90.0732	6.2294	100	-14.46	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 10	-84.5848	6.2294	100	-13.58	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 7	15.8918	4.4056	100	3.61	0.0005

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 8	25.7700	4.4056	100	5.85	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 9	34.9937	4.4056	100	7.94	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 10	31.3278	4.4056	100	7.11	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB	linear nivel_PB	-89.6007	3.1147	100	-28.77	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB	quadr nivel_PB	26.9958	2.2028	100	12.26	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Dias	linear dias	-61.3501	1.9186	100	-31.98	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Dias	quadr dias	23.8512	1.9186	100	12.43	<.0001

Least Squares Means							
Effect	Nivel_PB	Dias	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	6.03	7	237.33	7.7494	100	30.63	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	8	212.33	7.7494	100	27.40	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	9	180.74	7.7494	100	23.32	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	10	168.73	7.7494	100	21.77	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	7	179.80	2.8084	100	64.02	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	8	123.64	2.8084	100	44.03	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	9	93.9333	2.8084	100	33.45	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	10	83.7800	2.8084	100	29.83	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	7	168.47	2.2753	100	74.04	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	8	98.6167	2.2753	100	43.34	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	9	72.7317	2.2753	100	31.97	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	10	70.8783	2.2753	100	31.15	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	7	133.73	2.8013	100	47.74	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	8	87.5667	2.8013	100	31.26	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	9	69.2650	2.8013	100	24.73	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	10	66.9850	2.8013	100	23.91	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	7	148.12	3.3253	100	44.54	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	8	72.7033	3.3253	100	21.86	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	9	65.2250	3.3253	100	19.61	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	10	57.4483	3.3253	100	17.28	<.0001
Nivel_PB	6.03		199.78	3.8747	100	51.56	<.0001
Nivel_PB	13.42		120.29	1.4042	100	85.66	<.0001
Nivel_PB	15.37		102.67	1.1376	100	90.25	<.0001
Nivel_PB	19.01		89.3875	1.4007	100	63.82	<.0001
Nivel_PB	21.6		85.8746	1.6627	100	51.65	<.0001
Dias		7	173.49	1.9186	100	90.43	<.0001
Dias		8	118.97	1.9186	100	62.01	<.0001
Dias		9	96.3797	1.9186	100	50.24	<.0001
Dias		10	89.5647	1.9186	100	46.68	<.0001

MLMS

The Mixed Procedure

Model Information	
Data Set	WORK.NICOLAS3
Dependent Variable	MLMS
Covariance Structure	Variance Components
Subject Effect	Rep

Model Information	
Group Effect	Nivel_PB
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	None
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Between-Within

Class Level Information		
Class	Levels	Values
Nivel_PB	5	6.03 13.42 15.37 19.01 21.6
Dias	4	7 8 9 10

Dimensions	
Covariance Parameters	5
Columns in X	30
Columns in Z	0
Subjects	120
Max Obs per Subject	1

Number of Observations	
Number of Observations Read	120
Number of Observations Used	120
Number of Observations Not Used	0

Iteration History			
Iteration	Evaluations	-2 Res Log Like	Criterion
0	1	433.88546787	
1	1	420.00591166	0.00000000

Convergence criteria met.

Covariance Parameter Estimates			
Cov Parm	Subject	Group	Estimate
Dias	Rep	Nivel_PB 6.03	2.1501
Dias	Rep	Nivel_PB 13.42	0.9663
Dias	Rep	Nivel_PB 15.37	3.8486
Dias	Rep	Nivel_PB 19.01	4.5704
Dias	Rep	Nivel_PB 21.6	4.1396

Fit Statistics	
-2 Res Log Likelihood	420.0
AIC (Smaller is Better)	430.0
AICC (Smaller is Better)	430.6
BIC (Smaller is Better)	443.9

Null Model Likelihood Ratio Test		
DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
4	13.88	0.0077

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Nivel_PB	4	100	478.68	<.0001
Dias	3	100	7.29	0.0002

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Nivel_PB*Dias	12	100	3.11	0.0009

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 7	17.8066	0.7048	100	25.26	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 8	14.2892	0.7048	100	20.27	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 9	13.0026	0.7048	100	18.45	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 10	15.1479	0.7048	100	21.49	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 7	-0.5154	0.6843	100	-0.75	0.4530

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 8	0.007784	0.6843	100	0.01	0.9909

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 9	-1.0043	0.6843	100	-1.47	0.1453

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 10	-1.2735	0.6843	100	-1.86	0.0657

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB	linear nivel_PB	15.0616	0.3524	100	42.74	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB	quadr nivel_PB	-0.6964	0.3421	100	-2.04	0.0445

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Dias	linear dias	-0.9294	0.3233	100	-2.87	0.0049

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Dias	quadr dias	1.1602	0.3233	100	3.59	0.0005

Least Squares Means							
Effect	Nivel_PB	Dias	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	6.03	7	7.8983	0.5986	100	13.19	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	8	8.7783	0.5986	100	14.66	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	9	9.2900	0.5986	100	15.52	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	10	8.0000	0.5986	100	13.36	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	7	18.4683	0.4013	100	46.02	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	8	17.1983	0.4013	100	42.85	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	9	17.4150	0.4013	100	43.39	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	10	18.0383	0.4013	100	44.95	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	7	21.4400	0.8009	100	26.77	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	8	20.4950	0.8009	100	25.59	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	9	21.2750	0.8009	100	26.56	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	10	21.7400	0.8009	100	27.14	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	7	29.6433	0.8728	100	33.96	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	8	23.9817	0.8728	100	27.48	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	9	23.6467	0.8728	100	27.09	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	10	24.7200	0.8728	100	28.32	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	7	29.5667	0.8306	100	35.60	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	8	27.4667	0.8306	100	33.07	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	9	26.0417	0.8306	100	31.35	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	10	27.6750	0.8306	100	33.32	<.0001
Nivel_PB	6.03		8.4917	0.2993	100	28.37	<.0001
Nivel_PB	13.42		17.7800	0.2007	100	88.61	<.0001
Nivel_PB	15.37		21.2375	0.4004	100	53.03	<.0001
Nivel_PB	19.01		25.4979	0.4364	100	58.43	<.0001
Nivel_PB	21.6		27.6875	0.4153	100	66.67	<.0001
Dias		7	21.4033	0.3233	100	66.21	<.0001
Dias		8	19.5840	0.3233	100	60.58	<.0001
Dias		9	19.5337	0.3233	100	60.43	<.0001
Dias		10	20.0347	0.3233	100	61.98	<.0001

MFMS

The Mixed Procedure

Model Information	
Data Set	WORK.NICOLAS3
Dependent Variable	MFMS
Covariance Structure	Variance Components
Subject Effect	Rep
Group Effect	Nivel_PB
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	None
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Between-Within

Class Level Information		
Class	Levels	Values
Nivel_PB	5	6.03 13.42 15.37 19.01 21.6
Dias	4	7 8 9 10

Dimensions

Dimensions	
Covariance Parameters	5
Columns in X	30
Columns in Z	0
Subjects	120
Max Obs per Subject	1

Number of Observations	
Number of Observations Read	120
Number of Observations Used	120
Number of Observations Not Used	0

Iteration History			
Iteration	Evaluations	-2 Res Log Like	Criterion
0	1	550.58227350	
1	1	539.61279852	0.00000000

Convergence criteria met.

Covariance Parameter Estimates			
Cov Parm	Subject	Group	Estimate
Dias	Rep	Nivel_PB 6.03	13.6688
Dias	Rep	Nivel_PB 13.42	4.5663
Dias	Rep	Nivel_PB 15.37	6.5147
Dias	Rep	Nivel_PB 19.01	8.7155
Dias	Rep	Nivel_PB 21.6	16.8863

Fit Statistics	
-2 Res Log Likelihood	539.6
AIC (Smaller is Better)	549.6
AICC (Smaller is Better)	550.3
BIC (Smaller is Better)	563.6

Null Model Likelihood Ratio Test		
DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
4	10.97	0.0269

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Nivel_PB	4	100	654.82	<.0001
Dias	3	100	18.74	<.0001
Nivel_PB*Dias	12	100	3.62	0.0002

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 7	-40.1536	1.5226	100	-26.37	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 8	-38.4118	1.5226	100	-25.23	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 9	-31.3977	1.5226	100	-20.62	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 10	-38.2942	1.5226	100	-25.15	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 7	6.0872	1.3334	100	4.57	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 8	7.3267	1.3334	100	5.49	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 9	8.0844	1.3334	100	6.06	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 10	6.7096	1.3334	100	5.03	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB	linear nivel_PB	-37.0643	0.7613	100	-48.69	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB	quadr nivel_PB	7.0520	0.6667	100	10.58	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Dias	linear dias	-4.2812	0.5794	100	-7.39	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Dias	quadr dias	-0.7370	0.5794	100	-1.27	0.2063

Least Squares Means							
Effect	Nivel_PB	Dias	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	6.03	7	101.63	1.5093	100	67.33	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	8	99.7783	1.5093	100	66.11	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	9	92.9133	1.5093	100	61.56	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	10	95.2133	1.5093	100	63.08	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	7	71.8617	0.8724	100	82.37	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	8	70.8733	0.8724	100	81.24	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	9	67.1650	0.8724	100	76.99	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	10	63.9750	0.8724	100	73.33	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	7	64.3283	1.0420	100	61.73	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	8	59.0183	1.0420	100	56.64	<.0001

Least Squares Means							
Effect	Nivel_PB	Dias	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	15.37	9	58.7783	1.0420	100	56.41	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	10	57.0900	1.0420	100	54.79	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	7	54.2783	1.2052	100	45.04	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	8	57.6417	1.2052	100	47.83	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	9	55.9883	1.2052	100	46.45	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	10	53.9517	1.2052	100	44.76	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	7	50.5300	1.6776	100	30.12	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	8	49.1050	1.6776	100	29.27	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	9	52.4817	1.6776	100	31.28	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	10	43.5167	1.6776	100	25.94	<.0001
Nivel_PB	6.03		97.3833	0.7547	100	129.04	<.0001
Nivel_PB	13.42		68.4688	0.4362	100	156.97	<.0001
Nivel_PB	15.37		59.8038	0.5210	100	114.79	<.0001
Nivel_PB	19.01		55.4650	0.6026	100	92.04	<.0001
Nivel_PB	21.6		48.9083	0.8388	100	58.31	<.0001
Dias		7	68.5253	0.5794	100	118.27	<.0001
Dias		8	67.2833	0.5794	100	116.13	<.0001
Dias		9	65.4653	0.5794	100	112.99	<.0001
Dias		10	62.7493	0.5794	100	108.30	<.0001

MSL

The Mixed Procedure

Model Information	
Data Set	WORK.NICOLAS3
Dependent Variable	MSL
Covariance Structure	Variance Components
Subject Effect	Rep
Group Effect	Nivel_PB
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	None
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Between-Within

Class Level Information		
Class	Levels	Values
Nivel_PB	5	6.03 13.42 15.37 19.01 21.6
Dias	4	7 8 9 10

Dimensions	
Covariance Parameters	5
Columns in X	30
Columns in Z	0
Subjects	120
Max Obs per Subject	1

Number of Observations	
Number of Observations Read	120
Number of Observations Used	120

Number of Observations	
Number of Observations Not Used	0

Iteration History			
Iteration	Evaluations	-2 Res Log Like	Criterion
0	1	382.32060672	
1	1	371.71381665	0.00000000

Convergence criteria met.

Covariance Parameter Estimates			
Cov Parm	Subject	Group	Estimate
Dias	Rep	Nivel_PB 6.03	1.5804
Dias	Rep	Nivel_PB 13.42	0.7228
Dias	Rep	Nivel_PB 15.37	2.6743
Dias	Rep	Nivel_PB 19.01	1.5799
Dias	Rep	Nivel_PB 21.6	2.8024

Fit Statistics	
-2 Res Log Likelihood	371.7
AIC (Smaller is Better)	381.7
AICC (Smaller is Better)	382.4
BIC (Smaller is Better)	395.7

Null Model Likelihood Ratio Test		
DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
4	10.61	0.0314

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Nivel_PB	4	100	20.53	<.0001
Dias	3	100	102.42	<.0001
Nivel_PB*Dias	12	100	3.01	0.0013

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 7	0.6452	0.5668	100	1.14	0.2577

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 8	1.0300	0.5668	100	1.82	0.0722

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 9	3.7867	0.5668	100	6.68	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 10	3.2047	0.5668	100	5.65	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 7	0.005712	0.5716	100	0.01	0.9920

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 8	0.6690	0.5716	100	1.17	0.2446

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 9	0.8049	0.5716	100	1.41	0.1622

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 10	0.9060	0.5716	100	1.59	0.1161

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB	linear nivel_PB	2.1666	0.2834	100	7.64	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB	quadr nivel_PB	0.5964	0.2858	100	2.09	0.0394

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Dias	linear dias	4.2065	0.2498	100	16.84	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Dias	quadr dias	-0.7537	0.2498	100	-3.02	0.0032

Least Squares Means							
Effect	Nivel_PB	Dias	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	6.03	7	20.9283	0.5132	100	40.78	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	8	24.3517	0.5132	100	47.45	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	9	22.8983	0.5132	100	44.62	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	10	25.5583	0.5132	100	49.80	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	7	21.0017	0.3471	100	60.51	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	8	24.5050	0.3471	100	70.60	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	9	24.5633	0.3471	100	70.77	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	10	25.4250	0.3471	100	73.25	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	7	20.9900	0.6676	100	31.44	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	8	24.0550	0.6676	100	36.03	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	9	25.0917	0.6676	100	37.58	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	10	27.6167	0.6676	100	41.37	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	7	22.5483	0.5131	100	43.94	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	8	25.6150	0.5131	100	49.92	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	9	26.5300	0.5131	100	51.70	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	10	29.3317	0.5131	100	57.16	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	7	21.1517	0.6834	100	30.95	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	8	25.5317	0.6834	100	37.36	<.0001

Least Squares Means							
Effect	Nivel_PB	Dias	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	21.6	9	27.9850	0.6834	100	40.95	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	10	29.0383	0.6834	100	42.49	<.0001
Nivel_PB	6.03		23.4342	0.2566	100	91.32	<.0001
Nivel_PB	13.42		23.8737	0.1735	100	137.57	<.0001
Nivel_PB	15.37		24.4383	0.3338	100	73.21	<.0001
Nivel_PB	19.01		26.0063	0.2566	100	101.36	<.0001
Nivel_PB	21.6		25.9267	0.3417	100	75.87	<.0001
Dias		7	21.3240	0.2498	100	85.37	<.0001
Dias		8	24.8117	0.2498	100	99.33	<.0001
Dias		9	25.4137	0.2498	100	101.74	<.0001
Dias		10	27.3940	0.2498	100	109.67	<.0001

MSF

The Mixed Procedure

Model Information	
Data Set	WORK.NICOLAS3
Dependent Variable	MSF
Covariance Structure	Variance Components
Subject Effect	Rep
Group Effect	Nivel_PB
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	None
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Between-Within

Class Level Information		
Class	Levels	Values
Nivel_PB	5	6.03 13.42 15.37 19.01 21.6
Dias	4	7 8 9 10

Dimensions	
Covariance Parameters	5
Columns in X	30
Columns in Z	0
Subjects	120
Max Obs per Subject	1

Number of Observations	
Number of Observations Read	120
Number of Observations Used	120
Number of Observations Not Used	0

Iteration History			
Iteration	Evaluations	-2 Res Log Like	Criterion
0	1	609.54113183	
1	1	600.87549875	0.00000000

Convergence criteria met.

Covariance Parameter Estimates			
Cov Parm	Subject	Group	Estimate
Dias	Rep	Nivel_PB 6.03	27.9977
Dias	Rep	Nivel_PB 13.42	7.9601
Dias	Rep	Nivel_PB 15.37	19.8989
Dias	Rep	Nivel_PB 19.01	13.4086
Dias	Rep	Nivel_PB 21.6	21.5311

Fit Statistics	
-2 Res Log Likelihood	600.9
AIC (Smaller is Better)	610.9
AICC (Smaller is Better)	611.5
BIC (Smaller is Better)	624.8

Null Model Likelihood Ratio Test		
DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
4	8.67	0.0700

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Nivel_PB	4	100	47.98	<.0001
Dias	3	100	426.65	<.0001
Nivel_PB*Dias	12	100	12.67	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 7	-5.7667	2.0044	100	-2.88	0.0049

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 8	16.2642	2.0044	100	8.11	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 9	23.3190	2.0044	100	11.63	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 10	16.0412	2.0044	100	8.00	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 7	-0.5872	1.7771	100	-0.33	0.7418

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 8	-0.4983	1.7771	100	-0.28	0.7798

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 9	-9.1167	1.7771	100	-5.13	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 10	-11.8185	1.7771	100	-6.65	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB	linear nivel_PB	12.4645	1.0022	100	12.44	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB	quadr nivel_PB	-5.5052	0.8886	100	-6.20	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Dias	linear dias	26.0776	0.7780	100	33.52	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Dias	quadr dias	-9.6305	0.7780	100	-12.38	<.0001

Least Squares Means							
Effect	Nivel_PB	Dias	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	6.03	7	43.9083	2.1602	100	20.33	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	8	47.0800	2.1602	100	21.79	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	9	51.5417	2.1602	100	23.86	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	10	56.4717	2.1602	100	26.14	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	7	40.1083	1.1518	100	34.82	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	8	57.3883	1.1518	100	49.82	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	9	71.5133	1.1518	100	62.09	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	10	76.4383	1.1518	100	66.36	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	7	38.2733	1.8211	100	21.02	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	8	59.8450	1.8211	100	32.86	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	9	81.2250	1.8211	100	44.60	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	10	80.5483	1.8211	100	44.23	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	7	41.0233	1.4949	100	27.44	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	8	65.8067	1.4949	100	44.02	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	9	80.8200	1.4949	100	54.06	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	10	80.5350	1.4949	100	53.87	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	7	34.3450	1.8943	100	18.13	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	8	67.7050	1.8943	100	35.74	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	9	80.4817	1.8943	100	42.49	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	10	75.4500	1.8943	100	39.83	<.0001
Nivel_PB	6.03		49.7504	1.0801	100	46.06	<.0001
Nivel_PB	13.42		61.3621	0.5759	100	106.55	<.0001
Nivel_PB	15.37		64.9729	0.9106	100	71.35	<.0001
Nivel_PB	19.01		67.0463	0.7475	100	89.70	<.0001
Nivel_PB	21.6		64.4954	0.9472	100	68.09	<.0001
Dias		7	39.5317	0.7780	100	50.81	<.0001
Dias		8	59.5650	0.7780	100	76.56	<.0001
Dias		9	73.1163	0.7780	100	93.98	<.0001
Dias		10	73.8887	0.7780	100	94.97	<.0001

PBL

The Mixed Procedure

Model Information	
Data Set	WORK.NICOLAS3
Dependent Variable	PBL
Covariance Structure	Variance Components
Subject Effect	Rep
Group Effect	Nivel_PB
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	None
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Between-Within

Class Level Information		
Class	Levels	Values
Nivel_PB	5	6.03 13.42 15.37 19.01 21.6
Dias	4	7 8 9 10

Dimensions	
Covariance Parameters	5
Columns in X	30
Columns in Z	0
Subjects	120
Max Obs per Subject	1

Number of Observations	
Number of Observations Read	120
Number of Observations Used	120
Number of Observations Not Used	0

Iteration History			
Iteration	Evaluations	-2 Res Log Like	Criterion
0	1	401.19253557	
1	1	378.67213125	0.00000000

Convergence criteria met.

Covariance Parameter Estimates			
Cov Parm	Subject	Group	Estimate
Dias	Rep	Nivel_PB 6.03	4.1474
Dias	Rep	Nivel_PB 13.42	1.1620
Dias	Rep	Nivel_PB 15.37	0.5569
Dias	Rep	Nivel_PB 19.01	2.2140
Dias	Rep	Nivel_PB 21.6	3.2235

Fit Statistics	
-2 Res Log Likelihood	378.7
AIC (Smaller is Better)	388.7
AICC (Smaller is Better)	389.3
BIC (Smaller is Better)	402.6

Null Model Likelihood Ratio Test		
DF	Chi-Square	Pr > ChiSq

Null Model Likelihood Ratio Test		
DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
4	22.52	0.0002

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Nivel_PB	4	100	80.03	<.0001
Dias	3	100	11.73	<.0001
Nivel_PB*Dias	12	100	5.84	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 7	5.8015	0.7750	100	7.49	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 8	6.2353	0.7750	100	8.05	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 9	9.2782	0.7750	100	11.97	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 10	3.9355	0.7750	100	5.08	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 7	-0.9503	0.6183	100	-1.54	0.1275

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 8	-3.8429	0.6183	100	-6.22	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 9	-1.6541	0.6183	100	-2.68	0.0087

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 10	-1.6971	0.6183	100	-2.74	0.0072

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB	linear nivel_PB	6.3126	0.3875	100	16.29	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB	quadr nivel_PB	-2.0361	0.3091	100	-6.59	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Dias	linear dias	1.2430	0.2745	100	4.53	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Dias	quadr dias	-0.2278	0.2745	100	-0.83	0.4085

Least Squares Means							
Effect	Nivel_PB	Dias	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	6.03	7	31.1700	0.8314	100	37.49	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	8	31.1733	0.8314	100	37.49	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	9	28.8817	0.8314	100	34.74	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	10	34.3800	0.8314	100	41.35	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	7	34.2783	0.4401	100	77.89	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	8	38.5183	0.4401	100	87.53	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	9	37.0667	0.4401	100	84.23	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	10	37.4900	0.4401	100	85.19	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	7	38.1167	0.3047	100	125.12	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	8	39.2350	0.3047	100	128.79	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	9	37.1633	0.3047	100	121.99	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	10	39.5383	0.3047	100	129.78	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	7	37.3333	0.6075	100	61.46	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	8	40.6383	0.6075	100	66.90	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	9	39.6117	0.6075	100	65.21	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	10	39.8267	0.6075	100	65.56	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	7	38.5883	0.7330	100	52.65	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	8	38.4333	0.7330	100	52.43	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	9	41.1650	0.7330	100	56.16	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	10	38.8867	0.7330	100	53.05	<.0001
Nivel_PB	6.03		31.4013	0.4157	100	75.54	<.0001
Nivel_PB	13.42		36.8383	0.2200	100	167.42	<.0001
Nivel_PB	15.37		38.5133	0.1523	100	252.84	<.0001
Nivel_PB	19.01		39.3525	0.3037	100	129.57	<.0001
Nivel_PB	21.6		39.2683	0.3665	100	107.15	<.0001
Dias		7	35.8973	0.2745	100	130.77	<.0001
Dias		8	37.5997	0.2745	100	136.97	<.0001
Dias		9	36.7777	0.2745	100	133.97	<.0001
Dias		10	38.0243	0.2745	100	138.51	<.0001

PBF

The Mixed Procedure

Model Information	
Data Set	WORK.NICOLAS3
Dependent Variable	PBF
Covariance Structure	Variance Components
Subject Effect	Rep
Group Effect	Nivel_PB
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	None
Fixed Effects SE Method	Model-Based

Model Information	
Degrees of Freedom Method	Between-Within

Class Level Information		
Class	Levels	Values
Nivel_PB	5	6.03 13.42 15.37 19.01 21.6
Dias	4	7 8 9 10

Dimensions	
Covariance Parameters	5
Columns in X	30
Columns in Z	0
Subjects	120
Max Obs per Subject	1

Number of Observations	
Number of Observations Read	120
Number of Observations Used	120
Number of Observations Not Used	0

Iteration History			
Iteration	Evaluations	-2 Res Log Like	Criterion
0	1	394.21445717	
1	1	368.98576643	0.00000000

Convergence criteria met.

Covariance Parameter Estimates			
Cov Parm	Subject	Group	Estimate
Dias	Rep	Nivel_PB 6.03	1.6877
Dias	Rep	Nivel_PB 13.42	3.8578
Dias	Rep	Nivel_PB 15.37	1.1260
Dias	Rep	Nivel_PB 19.01	3.3965
Dias	Rep	Nivel_PB 21.6	0.4739

Fit Statistics	
-2 Res Log Likelihood	369.0
AIC (Smaller is Better)	379.0
AICC (Smaller is Better)	379.6
BIC (Smaller is Better)	392.9

Null Model Likelihood Ratio Test		
DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
4	25.23	<.0001

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Nivel_PB	4	100	402.92	<.0001
Dias	3	100	3.37	0.0215
Nivel_PB*Dias	12	100	0.73	0.7158

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 7	9.0916	0.5088	100	17.87	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 8	8.2979	0.5088	100	16.31	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 9	9.0101	0.5088	100	17.71	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 10	9.2620	0.5088	100	18.21	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 7	0.5901	0.5441	100	1.08	0.2807

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 8	0.2736	0.5441	100	0.50	0.6161

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 9	1.1814	0.5441	100	2.17	0.0323

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 10	0.5209	0.5441	100	0.96	0.3406

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB	linear nivel_PB	8.9154	0.2544	100	35.05	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB	quadr nivel_PB	0.6415	0.2720	100	2.36	0.0203

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Dias	linear dias	0.1679	0.2651	100	0.63	0.5281

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Dias	quadr dias	-0.09267	0.2651	100	-0.35	0.7274

Least Squares Means							
Effect	Nivel_PB	Dias	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	6.03	7	5.4750	0.5304	100	10.32	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	8	6.7833	0.5304	100	12.79	<.0001

Least Squares Means							
Effect	Nivel_PB	Dias	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	6.03	9	5.7500	0.5304	100	10.84	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	10	5.9333	0.5304	100	11.19	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	7	9.9000	0.8018	100	12.35	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	8	11.5400	0.8018	100	14.39	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	9	8.7517	0.8018	100	10.91	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	10	10.0667	0.8018	100	12.55	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	7	12.2667	0.4332	100	28.32	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	8	12.7983	0.4332	100	29.54	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	9	12.7667	0.4332	100	29.47	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	10	13.5350	0.4332	100	31.24	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	7	15.3933	0.7524	100	20.46	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	8	16.0733	0.7524	100	21.36	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	9	14.9767	0.7524	100	19.91	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	10	15.7233	0.7524	100	20.90	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	7	17.0083	0.2810	100	60.52	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	8	17.3583	0.2810	100	61.76	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	9	17.1767	0.2810	100	61.12	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	10	17.7467	0.2810	100	63.15	<.0001
Nivel_PB	6.03		5.9854	0.2652	100	22.57	<.0001
Nivel_PB	13.42		10.0646	0.4009	100	25.10	<.0001
Nivel_PB	15.37		12.8417	0.2166	100	59.29	<.0001
Nivel_PB	19.01		15.5417	0.3762	100	41.31	<.0001
Nivel_PB	21.6		17.3225	0.1405	100	123.27	<.0001
Dias		7	12.0087	0.2651	100	45.30	<.0001
Dias		8	12.9107	0.2651	100	48.70	<.0001
Dias		9	11.8843	0.2651	100	44.83	<.0001
Dias		10	12.6010	0.2651	100	47.53	<.0001

EEL

The Mixed Procedure

Model Information	
Data Set	WORK.NICOLAS3
Dependent Variable	EEL
Covariance Structure	Variance Components
Subject Effect	Rep
Group Effect	Nivel_PB
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	None
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Between-Within

Class Level Information		
Class	Levels	Values
Nivel_PB	5	6.03 13.42 15.37 19.01 21.6
Dias	4	7 8 9 10

Dimensions	
Covariance Parameters	5
Columns in X	30

Dimensions	
Columns in Z	0
Subjects	120
Max Obs per Subject	1

Number of Observations	
Number of Observations Read	120
Number of Observations Used	120
Number of Observations Not Used	0

Iteration History			
Iteration	Evaluations	-2 Res Log Like	Criterion
0	1	469.65889746	
1	1	452.03373681	0.00000000

Convergence criteria met.

Covariance Parameter Estimates			
Cov Parm	Subject	Group	Estimate
Dias	Rep	Nivel_PB 6.03	6.7432
Dias	Rep	Nivel_PB 13.42	1.1642
Dias	Rep	Nivel_PB 15.37	7.1894
Dias	Rep	Nivel_PB 19.01	3.3443
Dias	Rep	Nivel_PB 21.6	3.9754

Fit Statistics	
-2 Res Log Likelihood	452.0
AIC (Smaller is Better)	462.0
AICC (Smaller is Better)	462.7
BIC (Smaller is Better)	476.0

Null Model Likelihood Ratio Test		
DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
4	17.63	0.0015

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Nivel_PB	4	100	37.75	<.0001
Dias	3	100	30.19	<.0001
Nivel_PB*Dias	12	100	16.62	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 7	11.9929	0.9526	100	12.59	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 8	7.1663	0.9526	100	7.52	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 9	-1.3826	0.9526	100	-1.45	0.1498

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 10	0.8499	0.9526	100	0.89	0.3744

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 7	-0.9931	0.8678	100	-1.14	0.2552

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 8	-3.4673	0.8678	100	-4.00	0.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 9	0.7607	0.8678	100	0.88	0.3828

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 10	-0.3112	0.8678	100	-0.36	0.7207

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB	linear nivel_PB	4.6566	0.4763	100	9.78	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB	quadr nivel_PB	-1.0027	0.4339	100	-2.31	0.0229

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Dias	linear dias	3.5387	0.3866	100	9.15	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Dias	quadr dias	0.9608	0.3866	100	2.49	0.0146

Least Squares Means							
Effect	Nivel_PB	Dias	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	6.03	7	17.9883	1.0601	100	16.97	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	8	21.1867	1.0601	100	19.98	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	9	30.8133	1.0601	100	29.07	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	10	32.0700	1.0601	100	30.25	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	7	24.8450	0.4405	100	56.40	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	8	29.1550	0.4405	100	66.19	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	9	29.4100	0.4405	100	66.77	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	10	29.2600	0.4405	100	66.43	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	7	29.0767	1.0946	100	26.56	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	8	29.8283	1.0946	100	27.25	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	9	28.6933	1.0946	100	26.21	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	10	32.8217	1.0946	100	29.98	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	7	32.0267	0.7466	100	42.90	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	8	30.7783	0.7466	100	41.23	<.0001

Least Squares Means							
Effect	Nivel_PB	Dias	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	19.01	9	29.1833	0.7466	100	39.09	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	10	37.1783	0.7466	100	49.80	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	7	32.7950	0.8140	100	40.29	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	8	30.2117	0.8140	100	37.12	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	9	28.9933	0.8140	100	35.62	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	10	29.8000	0.8140	100	36.61	<.0001
Nivel_PB	6.03		25.5146	0.5301	100	48.13	<.0001
Nivel_PB	13.42		28.1675	0.2202	100	127.89	<.0001
Nivel_PB	15.37		30.1050	0.5473	100	55.00	<.0001
Nivel_PB	19.01		32.2917	0.3733	100	86.51	<.0001
Nivel_PB	21.6		30.4500	0.4070	100	74.82	<.0001
Dias		7	27.3463	0.3866	100	70.74	<.0001
Dias		8	28.2320	0.3866	100	73.03	<.0001
Dias		9	29.4187	0.3866	100	76.10	<.0001
Dias		10	32.2260	0.3866	100	83.36	<.0001

BCLMN

The Mixed Procedure

Model Information	
Data Set	WORK.NICOLAS3
Dependent Variable	BCLMN
Covariance Structure	Variance Components
Subject Effect	Rep
Group Effect	Nivel_PB
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	None
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Between-Within

Class Level Information		
Class	Levels	Values
Nivel_PB	5	6.03 13.42 15.37 19.01 21.6
Dias	4	7 8 9 10

Dimensions	
Covariance Parameters	5
Columns in X	30
Columns in Z	0
Subjects	120
Max Obs per Subject	1

Number of Observations	
Number of Observations Read	120
Number of Observations Used	120
Number of Observations Not Used	0

Iteration History			
Iteration	Evaluations	-2 Res Log Like	Criterion
0	1	304.74688640	

Iteration History			
Iteration	Evaluations	-2 Res Log Like	Criterion
1	1	278.18301179	0.00000000

Convergence criteria met.

Covariance Parameter Estimates			
Cov Parm	Subject	Group	Estimate
Dias	Rep	Nivel_PB 6.03	0.5584
Dias	Rep	Nivel_PB 13.42	0.2693
Dias	Rep	Nivel_PB 15.37	0.3429
Dias	Rep	Nivel_PB 19.01	1.4264
Dias	Rep	Nivel_PB 21.6	1.7118

Fit Statistics	
-2 Res Log Likelihood	278.2
AIC (Smaller is Better)	288.2
AICC (Smaller is Better)	288.8
BIC (Smaller is Better)	302.1

Null Model Likelihood Ratio Test		
DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
4	26.56	<.0001

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Nivel_PB	4	100	492.23	<.0001
Dias	3	100	104.36	<.0001
Nivel_PB*Dias	12	100	10.28	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 7	11.2744	0.4061	100	27.77	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 8	7.5659	0.4061	100	18.63	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 9	5.7651	0.4061	100	14.20	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 10	6.7158	0.4061	100	16.54	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 7	-0.3562	0.3617	100	-0.99	0.3270

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 8	-0.4162	0.3617	100	-1.15	0.2525

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 9	-1.2230	0.3617	100	-3.38	0.0010

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 10	-1.1911	0.3617	100	-3.29	0.0014

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB	linear nivel_PB	7.8303	0.2030	100	38.57	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB	quadr nivel_PB	-0.7966	0.1808	100	-4.41	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Dias	linear dias	-2.6611	0.1695	100	-15.70	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Dias	quadr dias	1.2492	0.1695	100	7.37	<.0001

Least Squares Means							
Effect	Nivel_PB	Dias	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	6.03	7	5.2350	0.3051	100	17.16	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	8	4.9817	0.3051	100	16.33	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	9	5.6217	0.3051	100	18.43	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	10	4.3433	0.3051	100	14.24	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	7	12.2133	0.2119	100	57.65	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	8	9.7583	0.2119	100	46.06	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	9	9.8517	0.2119	100	46.50	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	10	9.8533	0.2119	100	46.51	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	7	14.1867	0.2391	100	59.34	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	8	11.8283	0.2391	100	49.48	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	9	11.7450	0.2391	100	49.13	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	10	10.9317	0.2391	100	45.72	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	7	18.2800	0.4876	100	37.49	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	8	12.9933	0.4876	100	26.65	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	9	12.3900	0.4876	100	25.41	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	10	11.7183	0.4876	100	24.03	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	7	19.4467	0.5341	100	36.41	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	8	14.9533	0.5341	100	28.00	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	9	12.9317	0.5341	100	24.21	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	10	13.3383	0.5341	100	24.97	<.0001
Nivel_PB	6.03		5.0454	0.1525	100	33.08	<.0001
Nivel_PB	13.42		10.4192	0.1059	100	98.35	<.0001

Least Squares Means							
Effect	Nivel_PB	Dias	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB	15.37		12.1729	0.1195	100	101.83	<.0001
Nivel_PB	19.01		13.8454	0.2438	100	56.79	<.0001
Nivel_PB	21.6		15.1675	0.2671	100	56.79	<.0001
Dias		7	13.8723	0.1695	100	81.85	<.0001
Dias		8	10.9030	0.1695	100	64.33	<.0001
Dias		9	10.5080	0.1695	100	62.00	<.0001
Dias		10	10.0370	0.1695	100	59.22	<.0001

BCLMS

The Mixed Procedure

Model Information	
Data Set	WORK.NICOLAS3
Dependent Variable	BCLMS
Covariance Structure	Variance Components
Subject Effect	Rep
Group Effect	Nivel_PB
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	None
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Between-Within

Class Level Information		
Class	Levels	Values
Nivel_PB	5	6.03 13.42 15.37 19.01 21.6
Dias	4	7 8 9 10

Dimensions	
Covariance Parameters	5
Columns in X	30
Columns in Z	0
Subjects	120
Max Obs per Subject	1

Number of Observations	
Number of Observations Read	120
Number of Observations Used	120
Number of Observations Not Used	0

Iteration History			
Iteration	Evaluations	-2 Res Log Like	Criterion
0	1	402.33633983	
1	1	385.00511738	0.00000000

Convergence criteria met.

Covariance Parameter Estimates			
Cov Parm	Subject	Group	Estimate
Dias	Rep	Nivel_PB 6.03	1.2712
Dias	Rep	Nivel_PB 13.42	0.6550

Covariance Parameter Estimates			
Cov Parm	Subject	Group	Estimate
Dias	Rep	Nivel_PB 15.37	2.8601
Dias	Rep	Nivel_PB 19.01	3.4146
Dias	Rep	Nivel_PB 21.6	3.2330

Fit Statistics	
-2 Res Log Likelihood	385.0
AIC (Smaller is Better)	395.0
AICC (Smaller is Better)	395.6
BIC (Smaller is Better)	408.9

Null Model Likelihood Ratio Test		
DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
4	17.33	0.0017

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Nivel_PB	4	100	614.15	<.0001
Dias	3	100	7.67	0.0001
Nivel_PB*Dias	12	100	3.22	0.0006

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 7	16.3759	0.5880	100	27.85	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 8	13.3731	0.5880	100	22.74	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 9	12.2834	0.5880	100	20.89	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 10	14.0661	0.5880	100	23.92	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 7	-0.07197	0.5843	100	-0.12	0.9022

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 8	0.2901	0.5843	100	0.50	0.6207

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 9	-0.6114	0.5843	100	-1.05	0.2979

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 10	-0.7564	0.5843	100	-1.29	0.1985

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB	linear nivel_PB	14.0246	0.2940	100	47.70	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB	quadr nivel_PB	-0.2874	0.2922	100	-0.98	0.3276

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Dias	linear dias	-0.8116	0.2761	100	-2.94	0.0041

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Dias	quadr dias	1.0225	0.2761	100	3.70	0.0003

Least Squares Means							
Effect	Nivel_PB	Dias	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	6.03	7	6.0717	0.4603	100	13.19	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	8	6.7450	0.4603	100	14.65	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	9	7.1417	0.4603	100	15.52	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	10	6.1483	0.4603	100	13.36	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	7	15.2067	0.3304	100	46.02	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	8	14.1600	0.3304	100	42.86	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	9	14.3383	0.3304	100	43.40	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	10	14.8500	0.3304	100	44.95	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	7	18.4850	0.6904	100	26.77	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	8	17.6717	0.6904	100	25.60	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	9	18.3383	0.6904	100	26.56	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	10	18.7400	0.6904	100	27.14	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	7	25.6200	0.7544	100	33.96	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	8	20.7267	0.7544	100	27.47	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	9	20.4383	0.7544	100	27.09	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	10	21.3650	0.7544	100	28.32	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	7	26.1217	0.7340	100	35.59	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	8	24.2667	0.7340	100	33.06	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	9	23.0100	0.7340	100	31.35	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	10	24.4533	0.7340	100	33.31	<.0001
Nivel_PB	6.03		6.5267	0.2301	100	28.36	<.0001
Nivel_PB	13.42		14.6387	0.1652	100	88.61	<.0001
Nivel_PB	15.37		18.3088	0.3452	100	53.04	<.0001
Nivel_PB	19.01		22.0375	0.3772	100	58.43	<.0001
Nivel_PB	21.6		24.4629	0.3670	100	66.65	<.0001
Dias		7	18.3010	0.2761	100	66.29	<.0001
Dias		8	16.7140	0.2761	100	60.54	<.0001
Dias		9	16.6533	0.2761	100	60.32	<.0001
Dias		10	17.1113	0.2761	100	61.98	<.0001

BCFMN

The Mixed Procedure

Model Information	
Data Set	WORK.NICOLAS3
Dependent Variable	BCFMN
Covariance Structure	Variance Components
Subject Effect	Rep
Group Effect	Nivel_PB
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	None
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Between-Within

Class Level Information		
Class	Levels	Values
Nivel_PB	5	6.03 13.42 15.37 19.01 21.6
Dias	4	7 8 9 10

Dimensions	
Covariance Parameters	5
Columns in X	30
Columns in Z	0
Subjects	120
Max Obs per Subject	1

Number of Observations	
Number of Observations Read	120
Number of Observations Used	120
Number of Observations Not Used	0

Iteration History			
Iteration	Evaluations	-2 Res Log Like	Criterion
0	1	395.16321371	
1	1	349.23141126	0.00000000

Convergence criteria met.

Covariance Parameter Estimates			
Cov Parm	Subject	Group	Estimate
Dias	Rep	Nivel_PB 6.03	6.9471
Dias	Rep	Nivel_PB 13.42	0.9122
Dias	Rep	Nivel_PB 15.37	0.5988
Dias	Rep	Nivel_PB 19.01	0.9062
Dias	Rep	Nivel_PB 21.6	1.2780

Fit Statistics	
-2 Res Log Likelihood	349.2
AIC (Smaller is Better)	359.2
AICC (Smaller is Better)	359.9
BIC (Smaller is Better)	373.2

Null Model Likelihood Ratio Test		
DF	Chi-Square	Pr > ChiSq

Null Model Likelihood Ratio Test		
DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
4	45.93	<.0001

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Nivel_PB	4	100	243.87	<.0001
Dias	3	100	393.81	<.0001
Nivel_PB*Dias	12	100	7.27	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 7	-10.5960	0.8649	100	-12.25	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 8	-14.9240	0.8649	100	-17.25	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 9	-12.5114	0.8649	100	-14.47	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 10	-11.7484	0.8649	100	-13.58	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 7	2.2043	0.6117	100	3.60	0.0005

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 8	3.5792	0.6117	100	5.85	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 9	4.8596	0.6117	100	7.94	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 10	4.3509	0.6117	100	7.11	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB	linear nivel_PB	-12.4449	0.4325	100	-28.78	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB	quadr nivel_PB	3.7485	0.3058	100	12.26	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Dias	linear dias	-8.5201	0.2664	100	-31.99	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Dias	quadr dias	3.3132	0.2664	100	12.44	<.0001

Least Squares Means							
Effect	Nivel_PB	Dias	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	6.03	7	32.9617	1.0760	100	30.63	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	8	29.4900	1.0760	100	27.41	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	9	25.1050	1.0760	100	23.33	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	10	23.4367	1.0760	100	21.78	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	7	24.9733	0.3899	100	64.05	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	8	17.1717	0.3899	100	44.04	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	9	13.0467	0.3899	100	33.46	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	10	11.6383	0.3899	100	29.85	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	7	23.4017	0.3159	100	74.08	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	8	13.6983	0.3159	100	43.36	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	9	10.1033	0.3159	100	31.98	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	10	9.8450	0.3159	100	31.16	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	7	18.5733	0.3886	100	47.79	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	8	12.1617	0.3886	100	31.29	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	9	9.6217	0.3886	100	24.76	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	10	9.3050	0.3886	100	23.94	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	7	20.5717	0.4615	100	44.57	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	8	10.0983	0.4615	100	21.88	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	9	9.0583	0.4615	100	19.63	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	10	7.9800	0.4615	100	17.29	<.0001
Nivel_PB	6.03		27.7483	0.5380	100	51.58	<.0001
Nivel_PB	13.42		16.7075	0.1950	100	85.70	<.0001
Nivel_PB	15.37		14.2621	0.1580	100	90.29	<.0001
Nivel_PB	19.01		12.4154	0.1943	100	63.89	<.0001
Nivel_PB	21.6		11.9271	0.2308	100	51.69	<.0001
Dias		7	24.0963	0.2664	100	90.46	<.0001
Dias		8	16.5240	0.2664	100	62.04	<.0001
Dias		9	13.3870	0.2664	100	50.26	<.0001
Dias		10	12.4410	0.2664	100	46.71	<.0001

BCFMS

The Mixed Procedure

Model Information	
Data Set	WORK.NICOLAS3
Dependent Variable	BCFMS
Covariance Structure	Variance Components
Subject Effect	Rep
Group Effect	Nivel_PB
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	None
Fixed Effects SE Method	Model-Based

Model Information	
Degrees of Freedom Method	Between-Within

Class Level Information		
Class	Levels	Values
Nivel_PB	5	6.03 13.42 15.37 19.01 21.6
Dias	4	7 8 9 10

Dimensions	
Covariance Parameters	5
Columns in X	30
Columns in Z	0
Subjects	120
Max Obs per Subject	1

Number of Observations	
Number of Observations Read	120
Number of Observations Used	120
Number of Observations Not Used	0

Iteration History			
Iteration	Evaluations	-2 Res Log Like	Criterion
0	1	516.23695629	
1	1	504.63129781	0.00000000

Convergence criteria met.

Covariance Parameter Estimates			
Cov Parm	Subject	Group	Estimate
Dias	Rep	Nivel_PB 6.03	8.0729
Dias	Rep	Nivel_PB 13.42	3.0979
Dias	Rep	Nivel_PB 15.37	4.8504
Dias	Rep	Nivel_PB 19.01	6.5071
Dias	Rep	Nivel_PB 21.6	13.1870

Fit Statistics	
-2 Res Log Likelihood	504.6
AIC (Smaller is Better)	514.6
AICC (Smaller is Better)	515.3
BIC (Smaller is Better)	528.6

Null Model Likelihood Ratio Test		
DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
4	11.61	0.0205

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Nivel_PB	4	100	420.03	<.0001
Dias	3	100	18.33	<.0001
Nivel_PB*Dias	12	100	3.51	0.0002

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 7	-26.3958	1.2467	100	-21.17	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 8	-25.0433	1.2467	100	-20.09	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 9	-19.4666	1.2467	100	-15.61	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 10	-25.3695	1.2467	100	-20.35	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 7	2.8830	1.1254	100	2.56	0.0119

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 8	3.9946	1.1254	100	3.55	0.0006

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 9	4.9127	1.1254	100	4.37	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 10	3.4551	1.1254	100	3.07	0.0028

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB	linear nivel_PB	-24.0688	0.6234	100	-38.61	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB	quadr nivel_PB	3.8114	0.5627	100	6.77	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Dias	linear dias	-3.5501	0.4880	100	-7.28	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Dias	quadr dias	-0.6830	0.4880	100	-1.40	0.1647

Least Squares Means							
Effect	Nivel_PB	Dias	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	6.03	7	78.1117	1.1599	100	67.34	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	8	76.6883	1.1599	100	66.11	<.0001

Least Squares Means							
Effect	Nivel_PB	Dias	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	6.03	9	71.4167	1.1599	100	61.57	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	10	73.1800	1.1599	100	63.09	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	7	59.1650	0.7186	100	82.34	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	8	58.3500	0.7186	100	81.20	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	9	55.2933	0.7186	100	76.95	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	10	52.6700	0.7186	100	73.30	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	7	55.4567	0.8991	100	61.68	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	8	50.8800	0.8991	100	56.59	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	9	50.6767	0.8991	100	56.36	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	10	49.2200	0.8991	100	54.74	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	7	46.9083	1.0414	100	45.04	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	8	49.8150	1.0414	100	47.83	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	9	48.3900	1.0414	100	46.47	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	10	46.6317	1.0414	100	44.78	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	7	44.6450	1.4825	100	30.11	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	8	43.3867	1.4825	100	29.27	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	9	46.3700	1.4825	100	31.28	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	10	38.4483	1.4825	100	25.93	<.0001
Nivel_PB	6.03		74.8492	0.5800	100	129.06	<.0001
Nivel_PB	13.42		56.3696	0.3593	100	156.90	<.0001
Nivel_PB	15.37		51.5583	0.4496	100	114.69	<.0001
Nivel_PB	19.01		47.9362	0.5207	100	92.06	<.0001
Nivel_PB	21.6		43.2125	0.7413	100	58.30	<.0001
Dias		7	56.8573	0.4880	100	116.52	<.0001
Dias		8	55.8240	0.4880	100	114.40	<.0001
Dias		9	54.4293	0.4880	100	111.55	<.0001
Dias		10	52.0300	0.4880	100	106.63	<.0001

Número Larval

The Mixed Procedure

Model Information	
Data Set	WORK.NICOLAS3
Dependent Variable	NLA
Covariance Structure	Variance Components
Subject Effect	Rep
Group Effect	Nivel_PB
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	None
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Between-Within

Class Level Information		
Class	Levels	Values
Nivel_PB	5	6.03 13.42 15.37 19.01 21.6
Dias	4	7 8 9 10

Dimensions	
Covariance Parameters	5
Columns in X	30

Dimensions	
Columns in Z	0
Subjects	120
Max Obs per Subject	1

Number of Observations	
Number of Observations Read	120
Number of Observations Used	120
Number of Observations Not Used	0

Iteration History			
Iteration	Evaluations	-2 Res Log Like	Criterion
0	1	1584.96936857	
1	1	1570.65632645	0.00000000

Convergence criteria met.

Covariance Parameter Estimates			
Cov Parm	Subject	Group	Estimate
Dias	Rep	Nivel_PB 6.03	143914
Dias	Rep	Nivel_PB 13.42	250493
Dias	Rep	Nivel_PB 15.37	160300
Dias	Rep	Nivel_PB 19.01	540289
Dias	Rep	Nivel_PB 21.6	469231

Fit Statistics	
-2 Res Log Likelihood	1570.7
AIC (Smaller is Better)	1580.7
AICC (Smaller is Better)	1581.3
BIC (Smaller is Better)	1594.6

Null Model Likelihood Ratio Test		
DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
4	14.31	0.0064

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Nivel_PB	4	100	20.15	<.0001
Dias	3	100	13.57	<.0001
Nivel_PB*Dias	12	100	2.10	0.0235

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 7	1185.79	218.14	100	5.44	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 8	403.60	218.14	100	1.85	0.0672

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 9	506.32	218.14	100	2.32	0.0223

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 10	758.44	218.14	100	3.48	0.0008

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 7	-654.34	213.93	100	-3.06	0.0029

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 8	-246.38	213.93	100	-1.15	0.2522

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 9	-270.84	213.93	100	-1.27	0.2085

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 10	-183.23	213.93	100	-0.86	0.3938

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB	linear nivel_PB	713.54	109.07	100	6.54	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB	quadr nivel_PB	-338.70	106.97	100	-3.17	0.0020

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Dias	linear dias	-642.54	102.12	100	-6.29	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Dias	quadr dias	107.54	102.12	100	1.05	0.2949

Least Squares Means							
Effect	Nivel_PB	Dias	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	6.03	7	4151.42	154.87	100	26.81	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	8	4439.98	154.87	100	28.67	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	9	4071.90	154.87	100	26.29	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	10	3820.13	154.87	100	24.67	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	7	5394.46	204.33	100	26.40	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	8	5278.25	204.33	100	25.83	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	9	4943.64	204.33	100	24.19	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	10	4344.19	204.33	100	21.26	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	7	5356.67	163.45	100	32.77	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	8	4986.88	163.45	100	30.51	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	9	4542.43	163.45	100	27.79	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	10	4435.79	163.45	100	27.14	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	7	6342.33	300.08	100	21.14	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	8	4637.56	300.08	100	15.45	<.0001

Least Squares Means							
Effect	Nivel_PB	Dias	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	19.01	9	4691.34	300.08	100	15.63	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	10	5062.22	300.08	100	16.87	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	7	5271.55	279.65	100	18.85	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	8	5251.63	279.65	100	18.78	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	9	4829.72	279.65	100	17.27	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	10	4569.95	279.65	100	16.34	<.0001
Nivel_PB	6.03		4120.86	77.4366	100	53.22	<.0001
Nivel_PB	13.42		4990.14	102.16	100	48.84	<.0001
Nivel_PB	15.37		4830.44	81.7261	100	59.11	<.0001
Nivel_PB	19.01		5183.36	150.04	100	34.55	<.0001
Nivel_PB	21.6		4980.71	139.83	100	35.62	<.0001
Dias		7	5303.29	102.12	100	51.93	<.0001
Dias		8	4918.86	102.12	100	48.17	<.0001
Dias		9	4615.81	102.12	100	45.20	<.0001
Dias		10	4446.45	102.12	100	43.54	<.0001

Peso médio larvalmg

The Mixed Procedure

Model Information	
Data Set	WORK.NICOLAS3
Dependent Variable	PMLmg
Covariance Structure	Variance Components
Subject Effect	Rep
Group Effect	Nivel_PB
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	None
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Between-Within

Class Level Information		
Class	Levels	Values
Nivel_PB	5	6.03 13.42 15.37 19.01 21.6
Dias	4	7 8 9 10

Dimensions	
Covariance Parameters	5
Columns in X	30
Columns in Z	0
Subjects	120
Max Obs per Subject	1

Number of Observations	
Number of Observations Read	120
Number of Observations Used	120
Number of Observations Not Used	0

Iteration History			
Iteration	Evaluations	-2 Res Log Like	Criterion
0	1	463.94140003	

Iteration History			
Iteration	Evaluations	-2 Res Log Like	Criterion
1	1	439.14770453	0.00000000

Convergence criteria met.

Covariance Parameter Estimates			
Cov Parm	Subject	Group	Estimate
Dias	Rep	Nivel_PB 6.03	1.6890
Dias	Rep	Nivel_PB 13.42	1.8427
Dias	Rep	Nivel_PB 15.37	3.1375
Dias	Rep	Nivel_PB 19.01	3.7536
Dias	Rep	Nivel_PB 21.6	10.7479

Fit Statistics	
-2 Res Log Likelihood	439.1
AIC (Smaller is Better)	449.1
AICC (Smaller is Better)	449.8
BIC (Smaller is Better)	463.1

Null Model Likelihood Ratio Test		
DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
4	24.79	<.0001

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Nivel_PB	4	100	211.05	<.0001
Dias	3	100	10.02	<.0001
Nivel_PB*Dias	12	100	4.02	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 7	12.8412	0.8765	100	14.65	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 8	10.3550	0.8765	100	11.81	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 9	7.7114	0.8765	100	8.80	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 10	9.2175	0.8765	100	10.52	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 7	0.8773	0.8933	100	0.98	0.3284

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 8	-0.4144	0.8933	100	-0.46	0.6438

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 9	-1.3694	0.8933	100	-1.53	0.1285

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 10	-1.6509	0.8933	100	-1.85	0.0676

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB	linear nivel_PB	10.0313	0.4382	100	22.89	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB	quadr nivel_PB	-0.6393	0.4467	100	-1.43	0.1555

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Dias	linear dias	-1.4236	0.3757	100	-3.79	0.0003

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Dias	quadr dias	1.2487	0.3757	100	3.32	0.0012

Least Squares Means							
Effect	Nivel_PB	Dias	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	6.03	7	9.0633	0.5306	100	17.08	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	8	8.0533	0.5306	100	15.18	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	9	10.0417	0.5306	100	18.93	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	10	8.2283	0.5306	100	15.51	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	7	16.3450	0.5542	100	29.49	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	8	13.3917	0.5542	100	24.17	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	9	14.4100	0.5542	100	26.00	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	10	16.5583	0.5542	100	29.88	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	7	19.2033	0.7231	100	26.56	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	8	17.0933	0.7231	100	23.64	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	9	18.7233	0.7231	100	25.89	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	10	17.9167	0.7231	100	24.78	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	7	21.1467	0.7910	100	26.74	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	8	20.2750	0.7910	100	25.63	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	9	19.0283	0.7910	100	24.06	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	10	16.7300	0.7910	100	21.15	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	7	26.7533	1.3384	100	19.99	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	8	20.6517	1.3384	100	15.43	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	9	19.5083	1.3384	100	14.58	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	10	21.7183	1.3384	100	16.23	<.0001
Nivel_PB	6.03		8.8467	0.2653	100	33.35	<.0001
Nivel_PB	13.42		15.1763	0.2771	100	54.77	<.0001

Least Squares Means							
Effect	Nivel_PB	Dias	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB	15.37		18.2342	0.3616	100	50.43	<.0001
Nivel_PB	19.01		19.2950	0.3955	100	48.79	<.0001
Nivel_PB	21.6		22.1579	0.6692	100	33.11	<.0001
Dias		7	18.5023	0.3757	100	49.25	<.0001
Dias		8	15.8930	0.3757	100	42.30	<.0001
Dias		9	16.3423	0.3757	100	43.50	<.0001
Dias		10	16.2303	0.3757	100	43.20	<.0001

Nitrogênio larval g

The Mixed Procedure

Model Information	
Data Set	WORK.NICOLAS3
Dependent Variable	gNL
Covariance Structure	Variance Components
Subject Effect	Rep
Group Effect	Nivel_PB
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	None
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Between-Within

Class Level Information		
Class	Levels	Values
Nivel_PB	5	6.03 13.42 15.37 19.01 21.6
Dias	4	7 8 9 10

Dimensions	
Covariance Parameters	5
Columns in X	30
Columns in Z	0
Subjects	120
Max Obs per Subject	1

Number of Observations	
Number of Observations Read	120
Number of Observations Used	120
Number of Observations Not Used	0

Iteration History			
Iteration	Evaluations	-2 Res Log Like	Criterion
0	1	-101.15306910	
1	1	-131.41866085	0.00000000

Convergence criteria met.

Covariance Parameter Estimates			
Cov Parm	Subject	Group	Estimate
Dias	Rep	Nivel_PB 6.03	0.004954
Dias	Rep	Nivel_PB 13.42	0.003893

Covariance Parameter Estimates			
Cov Parm	Subject	Group	Estimate
Dias	Rep	Nivel_PB 15.37	0.01678
Dias	Rep	Nivel_PB 19.01	0.01447
Dias	Rep	Nivel_PB 21.6	0.03430

Fit Statistics	
-2 Res Log Likelihood	-131.4
AIC (Smaller is Better)	-121.4
AICC (Smaller is Better)	-120.8
BIC (Smaller is Better)	-107.5

Null Model Likelihood Ratio Test		
DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
4	30.27	<.0001

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Nivel_PB	4	100	664.02	<.0001
Dias	3	100	3.99	0.0099
Nivel_PB*Dias	12	100	2.63	0.0042

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 7	1.1661	0.04949	100	23.56	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 8	0.8768	0.04949	100	17.72	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 9	0.9883	0.04949	100	19.97	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 10	1.0075	0.04949	100	20.36	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 7	0.002364	0.05185	100	0.05	0.9637

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 8	-0.1701	0.05185	100	-3.28	0.0014

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 9	-0.02551	0.05185	100	-0.49	0.6238

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 10	-0.09752	0.05185	100	-1.88	0.0629

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB	linear nivel_PB	1.0097	0.02474	100	40.81	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB	quadr nivel_PB	-0.07270	0.02593	100	-2.80	0.0061

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Dias	linear dias	-0.01163	0.02227	100	-0.52	0.6028

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Dias	quadr dias	0.07367	0.02227	100	3.31	0.0013

Least Squares Means							
Effect	Nivel_PB	Dias	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	6.03	7	0.3967	0.02873	100	13.80	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	8	0.4367	0.02873	100	15.20	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	9	0.4283	0.02873	100	14.91	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	10	0.4367	0.02873	100	15.20	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	7	1.0117	0.02547	100	39.72	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	8	1.0600	0.02547	100	41.62	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	9	1.0317	0.02547	100	40.50	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	10	1.0817	0.02547	100	42.47	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	7	1.3100	0.05288	100	24.77	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	8	1.2850	0.05288	100	24.30	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	9	1.2633	0.05288	100	23.89	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	10	1.3733	0.05288	100	25.97	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	7	1.7650	0.04911	100	35.94	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	8	1.5550	0.04911	100	31.67	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	9	1.4967	0.04911	100	30.48	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	10	1.5767	0.04911	100	32.11	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	7	1.8283	0.07561	100	24.18	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	8	1.4933	0.07561	100	19.75	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	9	1.7150	0.07561	100	22.68	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	10	1.7217	0.07561	100	22.77	<.0001
Nivel_PB	6.03		0.4246	0.01437	100	29.55	<.0001
Nivel_PB	13.42		1.0462	0.01274	100	82.15	<.0001
Nivel_PB	15.37		1.3079	0.02644	100	49.46	<.0001
Nivel_PB	19.01		1.5983	0.02455	100	65.10	<.0001
Nivel_PB	21.6		1.6896	0.03781	100	44.69	<.0001
Dias		7	1.2623	0.02227	100	56.68	<.0001
Dias		8	1.1660	0.02227	100	52.36	<.0001
Dias		9	1.1870	0.02227	100	53.30	<.0001
Dias		10	1.2380	0.02227	100	55.59	<.0001

Nitrogênio do frass g

The Mixed Procedure

Model Information	
Data Set	WORK.NICOLAS3
Dependent Variable	gNF
Covariance Structure	Variance Components
Subject Effect	Rep
Group Effect	Nivel_PB
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	None
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Between-Within

Class Level Information		
Class	Levels	Values
Nivel_PB	5	6.03 13.42 15.37 19.01 21.6
Dias	4	7 8 9 10

Dimensions	
Covariance Parameters	5
Columns in X	30
Columns in Z	0
Subjects	120
Max Obs per Subject	1

Number of Observations	
Number of Observations Read	120
Number of Observations Used	120
Number of Observations Not Used	0

Iteration History			
Iteration	Evaluations	-2 Res Log Like	Criterion
0	1	3.86951469	
1	1	-34.03188957	0.00000000

Convergence criteria met.

Covariance Parameter Estimates			
Cov Parm	Subject	Group	Estimate
Dias	Rep	Nivel_PB 6.03	0.04790
Dias	Rep	Nivel_PB 13.42	0.1129
Dias	Rep	Nivel_PB 15.37	0.01079
Dias	Rep	Nivel_PB 19.01	0.02840
Dias	Rep	Nivel_PB 21.6	0.01261

Fit Statistics	
-2 Res Log Likelihood	-34.0
AIC (Smaller is Better)	-24.0
AICC (Smaller is Better)	-23.4
BIC (Smaller is Better)	-10.1

Null Model Likelihood Ratio Test		
DF	Chi-Square	Pr > ChiSq

Null Model Likelihood Ratio Test		
DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
4	37.90	<.0001

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Nivel_PB	4	100	23.24	<.0001
Dias	3	100	1.37	0.2574
Nivel_PB*Dias	12	100	1.41	0.1759

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 7	0.3864	0.07805	100	4.95	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 8	0.2790	0.07805	100	3.58	0.0005

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 9	0.4748	0.07805	100	6.08	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 10	0.3184	0.07805	100	4.08	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 7	-0.04893	0.08794	100	-0.56	0.5792

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 8	0.07960	0.08794	100	0.91	0.3676

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 9	0.1032	0.08794	100	1.17	0.2434

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 10	-0.05439	0.08794	100	-0.62	0.5377

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB	linear nivel_PB	0.3646	0.03902	100	9.34	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB	quadr nivel_PB	0.01987	0.04397	100	0.45	0.6523

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Dias	linear dias	-0.05150	0.03765	100	-1.37	0.1744

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Dias	quadr dias	-0.02383	0.03765	100	-0.63	0.5282

Least Squares Means							
Effect	Nivel_PB	Dias	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	6.03	7	0.8883	0.08935	100	9.94	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	8	1.0883	0.08935	100	12.18	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	9	0.8550	0.08935	100	9.57	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	10	0.9050	0.08935	100	10.13	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	7	1.1367	0.1372	100	8.28	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	8	1.0950	0.1372	100	7.98	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	9	0.9383	0.1372	100	6.84	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	10	1.0317	0.1372	100	7.52	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	7	1.2633	0.04241	100	29.79	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	8	1.2067	0.04241	100	28.45	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	9	1.2017	0.04241	100	28.33	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	10	1.2367	0.04241	100	29.16	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	7	1.3350	0.06880	100	19.40	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	8	1.4783	0.06880	100	21.49	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	9	1.3367	0.06880	100	19.43	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	10	1.3617	0.06880	100	19.79	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	7	1.3750	0.04584	100	29.99	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	8	1.3617	0.04584	100	29.70	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	9	1.4417	0.04584	100	31.45	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	10	1.2317	0.04584	100	26.87	<.0001
Nivel_PB	6.03		0.9342	0.04468	100	20.91	<.0001
Nivel_PB	13.42		1.0504	0.06860	100	15.31	<.0001
Nivel_PB	15.37		1.2271	0.02121	100	57.86	<.0001
Nivel_PB	19.01		1.3779	0.03440	100	40.05	<.0001
Nivel_PB	21.6		1.3525	0.02292	100	59.00	<.0001
Dias		7	1.1997	0.03765	100	31.86	<.0001
Dias		8	1.2460	0.03765	100	33.09	<.0001
Dias		9	1.1547	0.03765	100	30.67	<.0001
Dias		10	1.1533	0.03765	100	30.63	<.0001

Perda de N %

The Mixed Procedure

Model Information	
Data Set	WORK.NICOLAS3
Dependent Variable	PerdaNperc
Covariance Structure	Variance Components
Subject Effect	Rep
Group Effect	Nivel_PB
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	None
Fixed Effects SE Method	Model-Based

Model Information	
Degrees of Freedom Method	Between-Within

Class Level Information		
Class	Levels	Values
Nivel_PB	5	6.03 13.42 15.37 19.01 21.6
Dias	4	7 8 9 10

Dimensions	
Covariance Parameters	5
Columns in X	30
Columns in Z	0
Subjects	120
Max Obs per Subject	1

Number of Observations	
Number of Observations Read	120
Number of Observations Used	120
Number of Observations Not Used	0

Iteration History			
Iteration	Evaluations	-2 Res Log Like	Criterion
0	1	794.84833429	
1	1	731.58460922	0.00000000

Convergence criteria met.

Covariance Parameter Estimates			
Cov Parm	Subject	Group	Estimate
Dias	Rep	Nivel_PB 6.03	324.25
Dias	Rep	Nivel_PB 13.42	176.32
Dias	Rep	Nivel_PB 15.37	15.4588
Dias	Rep	Nivel_PB 19.01	32.1541
Dias	Rep	Nivel_PB 21.6	31.0497

Fit Statistics	
-2 Res Log Likelihood	731.6
AIC (Smaller is Better)	741.6
AICC (Smaller is Better)	742.2
BIC (Smaller is Better)	755.5

Null Model Likelihood Ratio Test		
DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
4	63.26	<.0001

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Nivel_PB	4	100	26.66	<.0001
Dias	3	100	1.24	0.3005
Nivel_PB*Dias	12	100	1.73	0.0704

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 7	13.4298	5.8094	100	2.31	0.0228

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 8	33.3629	5.8094	100	5.74	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 9	15.6797	5.8094	100	2.70	0.0082

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 10	21.5377	5.8094	100	3.71	0.0003

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 7	-5.1667	4.6349	100	-1.11	0.2676

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 8	-10.3625	4.6349	100	-2.24	0.0276

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 9	-10.0116	4.6349	100	-2.16	0.0332

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 10	-3.9364	4.6349	100	-0.85	0.3977

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB	linear nivel_PB	21.0025	2.9047	100	7.23	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB	quadr nivel_PB	-7.3693	2.3174	100	-3.18	0.0020

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Dias	linear dias	2.0679	1.9651	100	1.05	0.2952

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Dias	quadr dias	-0.7040	1.9651	100	-0.36	0.7209

Least Squares Means							
Effect	Nivel_PB	Dias	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	6.03	7	-2.4983	7.3513	100	-0.34	0.7347
Nivel_PB*Dias	6.03	8	-21.5100	7.3513	100	-2.93	0.0042

Least Squares Means							
Effect	Nivel_PB	Dias	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	6.03	9	-2.4083	7.3513	100	-0.33	0.7439
Nivel_PB*Dias	6.03	10	-6.8383	7.3513	100	-0.93	0.3545
Nivel_PB*Dias	13.42	7	17.5200	5.4209	100	3.23	0.0017
Nivel_PB*Dias	13.42	8	17.3950	5.4209	100	3.21	0.0018
Nivel_PB*Dias	13.42	9	24.4467	5.4209	100	4.51	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	10	19.0183	5.4209	100	3.51	0.0007
Nivel_PB*Dias	15.37	7	9.8200	1.6051	100	6.12	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	8	12.5600	1.6051	100	7.82	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	9	13.5500	1.6051	100	8.44	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	10	8.4333	1.6051	100	5.25	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	7	11.7933	2.3150	100	5.09	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	8	13.6667	2.3150	100	5.90	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	9	19.5233	2.3150	100	8.43	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	10	16.5967	2.3150	100	7.17	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	7	18.1033	2.2748	100	7.96	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	8	26.9467	2.2748	100	11.85	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	9	19.3067	2.2748	100	8.49	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	10	24.4883	2.2748	100	10.76	<.0001
Nivel_PB	6.03		-8.3138	3.6756	100	-2.26	0.0259
Nivel_PB	13.42		19.5950	2.7104	100	7.23	<.0001
Nivel_PB	15.37		11.0908	0.8026	100	13.82	<.0001
Nivel_PB	19.01		15.3950	1.1575	100	13.30	<.0001
Nivel_PB	21.6		22.2113	1.1374	100	19.53	<.0001
Dias		7	10.9477	1.9651	100	5.57	<.0001
Dias		8	9.8117	1.9651	100	4.99	<.0001
Dias		9	14.8837	1.9651	100	7.57	<.0001
Dias		10	12.3397	1.9651	100	6.28	<.0001

EUNL

The Mixed Procedure

Model Information	
Data Set	WORK.NICOLAS3
Dependent Variable	EUNL
Covariance Structure	Variance Components
Subject Effect	Rep
Group Effect	Nivel_PB
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	None
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Between-Within

Class Level Information		
Class	Levels	Values
Nivel_PB	5	6.03 13.42 15.37 19.01 21.6
Dias	4	7 8 9 10

Dimensions	
Covariance Parameters	5
Columns in X	30

Dimensions	
Columns in Z	0
Subjects	120
Max Obs per Subject	1

Number of Observations	
Number of Observations Read	120
Number of Observations Used	120
Number of Observations Not Used	0

Iteration History			
Iteration	Evaluations	-2 Res Log Like	Criterion
0	1	612.08749494	
1	1	596.08218099	0.00000000

Convergence criteria met.

Covariance Parameter Estimates			
Cov Parm	Subject	Group	Estimate
Dias	Rep	Nivel_PB 6.03	32.6444
Dias	Rep	Nivel_PB 13.42	5.6834
Dias	Rep	Nivel_PB 15.37	20.6442
Dias	Rep	Nivel_PB 19.01	11.7173
Dias	Rep	Nivel_PB 21.6	22.4489

Fit Statistics	
-2 Res Log Likelihood	596.1
AIC (Smaller is Better)	606.1
AICC (Smaller is Better)	606.7
BIC (Smaller is Better)	620.0

Null Model Likelihood Ratio Test		
DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
4	16.01	0.0030

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Nivel_PB	4	100	26.75	<.0001
Dias	3	100	1.95	0.1271
Nivel_PB*Dias	12	100	2.42	0.0086

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 7	13.7644	2.1144	100	6.51	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 8	4.4252	2.1144	100	2.09	0.0389

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 9	7.4195	2.1144	100	3.51	0.0007

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 10	7.6751	2.1144	100	3.63	0.0004

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 7	-2.6751	1.8155	100	-1.47	0.1438

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 8	-6.2502	1.8155	100	-3.44	0.0008

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 9	-2.4330	1.8155	100	-1.34	0.1832

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 10	-4.9327	1.8155	100	-2.72	0.0078

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB	linear nivel_PB	8.3210	1.0572	100	7.87	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB	quadr nivel_PB	-4.0728	0.9077	100	-4.49	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Dias	linear dias	0.07477	0.7880	100	0.09	0.9246

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Dias	quadr dias	1.8908	0.7880	100	2.40	0.0183

Least Squares Means							
Effect	Nivel_PB	Dias	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	6.03	7	31.5217	2.3325	100	13.51	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	8	34.7683	2.3325	100	14.91	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	9	34.2783	2.3325	100	14.70	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	10	34.8050	2.3325	100	14.92	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	7	38.8533	0.9733	100	39.92	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	8	40.6283	0.9733	100	41.74	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	9	39.5617	0.9733	100	40.65	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	10	41.4750	0.9733	100	42.61	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	7	45.8817	1.8549	100	24.74	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	8	45.1383	1.8549	100	24.33	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	9	44.3767	1.8549	100	23.92	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	10	48.2217	1.8549	100	26.00	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	7	50.2150	1.3975	100	35.93	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	8	44.2500	1.3975	100	31.66	<.0001

Least Squares Means							
Effect	Nivel_PB	Dias	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	19.01	9	42.5267	1.3975	100	30.43	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	10	44.7417	1.3975	100	32.02	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	7	46.7517	1.9343	100	24.17	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	8	38.2183	1.9343	100	19.76	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	9	43.8267	1.9343	100	22.66	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	10	44.0150	1.9343	100	22.76	<.0001
Nivel_PB	6.03		33.8433	1.1663	100	29.02	<.0001
Nivel_PB	13.42		40.1296	0.4866	100	82.46	<.0001
Nivel_PB	15.37		45.9046	0.9275	100	49.50	<.0001
Nivel_PB	19.01		45.4333	0.6987	100	65.02	<.0001
Nivel_PB	21.6		43.2029	0.9671	100	44.67	<.0001
Dias		7	42.6447	0.7880	100	54.12	<.0001
Dias		8	40.6007	0.7880	100	51.52	<.0001
Dias		9	40.9140	0.7880	100	51.92	<.0001
Dias		10	42.6517	0.7880	100	54.13	<.0001

EUNF

The Mixed Procedure

Model Information	
Data Set	WORK.NICOLAS3
Dependent Variable	EUNF
Covariance Structure	Variance Components
Subject Effect	Rep
Group Effect	Nivel_PB
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	None
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Between-Within

Class Level Information		
Class	Levels	Values
Nivel_PB	5	6.03 13.42 15.37 19.01 21.6
Dias	4	7 8 9 10

Dimensions	
Covariance Parameters	5
Columns in X	30
Columns in Z	0
Subjects	120
Max Obs per Subject	1

Number of Observations	
Number of Observations Read	120
Number of Observations Used	120
Number of Observations Not Used	0

Iteration History			
Iteration	Evaluations	-2 Res Log Like	Criterion
0	1	783.69579963	

Iteration History			
Iteration	Evaluations	-2 Res Log Like	Criterion
1	1	692.69780191	0.00000000

Convergence criteria met.

Covariance Parameter Estimates			
Cov Parm	Subject	Group	Estimate
Dias	Rep	Nivel_PB 6.03	307.23
Dias	Rep	Nivel_PB 13.42	166.43
Dias	Rep	Nivel_PB 15.37	13.3048
Dias	Rep	Nivel_PB 19.01	23.1042
Dias	Rep	Nivel_PB 21.6	8.0321

Fit Statistics	
-2 Res Log Likelihood	692.7
AIC (Smaller is Better)	702.7
AICC (Smaller is Better)	703.3
BIC (Smaller is Better)	716.6

Null Model Likelihood Ratio Test		
DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
4	91.00	<.0001

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Nivel_PB	4	100	46.10	<.0001
Dias	3	100	1.63	0.1873
Nivel_PB*Dias	12	100	1.34	0.2093

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 7	-27.1984	5.5482	100	-4.90	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 8	-37.7917	5.5482	100	-6.81	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 9	-23.1023	5.5482	100	-4.16	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 10	-29.2101	5.5482	100	-5.26	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 7	7.8436	4.3815	100	1.79	0.0765

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 8	16.6118	4.3815	100	3.79	0.0003

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 9	12.4443	4.3815	100	2.84	0.0055

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 10	8.8683	4.3815	100	2.02	0.0456

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB	linear nivel_PB	-29.3256	2.7741	100	-10.57	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB	quadr nivel_PB	11.4420	2.1908	100	5.22	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Dias	linear dias	-2.1435	1.8585	100	-1.15	0.2515

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Dias	quadr dias	-1.1887	1.8585	100	-0.64	0.5239

Least Squares Means							
Effect	Nivel_PB	Dias	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	6.03	7	70.9800	7.1558	100	9.92	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	8	86.7433	7.1558	100	12.12	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	9	68.1333	7.1558	100	9.52	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	10	72.0283	7.1558	100	10.07	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	7	43.6233	5.2667	100	8.28	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	8	41.9783	5.2667	100	7.97	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	9	35.9933	5.2667	100	6.83	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	10	39.5067	5.2667	100	7.50	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	7	44.3000	1.4891	100	29.75	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	8	42.3017	1.4891	100	28.41	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	9	42.0733	1.4891	100	28.25	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	10	43.3400	1.4891	100	29.10	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	7	37.9883	1.9623	100	19.36	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	8	42.0800	1.9623	100	21.44	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	9	37.9517	1.9623	100	19.34	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	10	38.6617	1.9623	100	19.70	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	7	35.1433	1.1570	100	30.37	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	8	34.8333	1.1570	100	30.11	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	9	36.8650	1.1570	100	31.86	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	10	31.4950	1.1570	100	27.22	<.0001
Nivel_PB	6.03		74.4712	3.5779	100	20.81	<.0001
Nivel_PB	13.42		40.2754	2.6333	100	15.29	<.0001

Least Squares Means							
Effect	Nivel_PB	Dias	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB	15.37		43.0038	0.7446	100	57.76	<.0001
Nivel_PB	19.01		39.1704	0.9812	100	39.92	<.0001
Nivel_PB	21.6		34.5842	0.5785	100	59.78	<.0001
Dias		7	46.4070	1.8585	100	24.97	<.0001
Dias		8	49.5873	1.8585	100	26.68	<.0001
Dias		9	44.2033	1.8585	100	23.78	<.0001
Dias		10	45.0063	1.8585	100	24.22	<.0001

DENSAR

The Mixed Procedure

Model Information	
Data Set	WORK.NICOLAS3
Dependent Variable	DENSAR
Covariance Structure	Variance Components
Subject Effect	Rep
Group Effect	Nivel_PB
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	None
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Between-Within

Class Level Information		
Class	Levels	Values
Nivel_PB	5	6.03 13.42 15.37 19.01 21.6
Dias	4	7 8 9 10

Dimensions	
Covariance Parameters	5
Columns in X	30
Columns in Z	0
Subjects	120
Max Obs per Subject	1

Number of Observations	
Number of Observations Read	120
Number of Observations Used	120
Number of Observations Not Used	0

Iteration History			
Iteration	Evaluations	-2 Res Log Like	Criterion
0	1	448.28606164	
1	1	433.96915839	0.00000000

Convergence criteria met.

Covariance Parameter Estimates			
Cov Parm	Subject	Group	Estimate
Dias	Rep	Nivel_PB 6.03	1.6652
Dias	Rep	Nivel_PB 13.42	2.9014

Covariance Parameter Estimates			
Cov Parm	Subject	Group	Estimate
Dias	Rep	Nivel_PB 15.37	1.8538
Dias	Rep	Nivel_PB 19.01	6.2508
Dias	Rep	Nivel_PB 21.6	5.4316

Fit Statistics	
-2 Res Log Likelihood	434.0
AIC (Smaller is Better)	444.0
AICC (Smaller is Better)	444.6
BIC (Smaller is Better)	457.9

Null Model Likelihood Ratio Test		
DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
4	14.32	0.0063

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Nivel_PB	4	100	20.13	<.0001
Dias	3	100	13.56	<.0001
Nivel_PB*Dias	12	100	2.10	0.0235

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 7	4.0319	0.7421	100	5.43	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 8	1.3723	0.7421	100	1.85	0.0674

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 9	1.7214	0.7421	100	2.32	0.0224

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 10	2.5799	0.7421	100	3.48	0.0008

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 7	-2.2252	0.7279	100	-3.06	0.0029

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 8	-0.8411	0.7279	100	-1.16	0.2506

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 9	-0.9182	0.7279	100	-1.26	0.2101

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 10	-0.6218	0.7279	100	-0.85	0.3950

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB	linear nivel_PB	2.4264	0.3710	100	6.54	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB	quadr nivel_PB	-1.1516	0.3639	100	-3.16	0.0021

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Dias	linear dias	-2.1849	0.3474	100	-6.29	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Dias	quadr dias	0.3667	0.3474	100	1.06	0.2938

Least Squares Means							
Effect	Nivel_PB	Dias	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	6.03	7	14.1217	0.5268	100	26.81	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	8	15.1000	0.5268	100	28.66	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	9	13.8517	0.5268	100	26.29	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	10	12.9950	0.5268	100	24.67	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	7	18.3483	0.6954	100	26.39	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	8	17.9550	0.6954	100	25.82	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	9	16.8133	0.6954	100	24.18	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	10	14.7750	0.6954	100	21.25	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	7	18.2200	0.5558	100	32.78	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	8	16.9617	0.5558	100	30.51	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	9	15.4483	0.5558	100	27.79	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	10	15.0883	0.5558	100	27.14	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	7	21.5717	1.0207	100	21.13	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	8	15.7733	1.0207	100	15.45	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	9	15.9567	1.0207	100	15.63	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	10	17.2200	1.0207	100	16.87	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	7	17.9300	0.9515	100	18.84	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	8	17.8600	0.9515	100	18.77	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	9	16.4283	0.9515	100	17.27	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	10	15.5450	0.9515	100	16.34	<.0001
Nivel_PB	6.03		14.0171	0.2634	100	53.22	<.0001
Nivel_PB	13.42		16.9729	0.3477	100	48.82	<.0001
Nivel_PB	15.37		16.4296	0.2779	100	59.12	<.0001
Nivel_PB	19.01		17.6304	0.5103	100	34.55	<.0001
Nivel_PB	21.6		16.9408	0.4757	100	35.61	<.0001
Dias		7	18.0383	0.3474	100	51.92	<.0001
Dias		8	16.7300	0.3474	100	48.16	<.0001
Dias		9	15.6997	0.3474	100	45.19	<.0001
Dias		10	15.1247	0.3474	100	43.54	<.0001

DENSVOL

The Mixed Procedure

Model Information	
Data Set	WORK.NICOLAS3
Dependent Variable	DENSVOL
Covariance Structure	Variance Components
Subject Effect	Rep
Group Effect	Nivel_PB
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	None
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Between-Within

Class Level Information		
Class	Levels	Values
Nivel_PB	5	6.03 13.42 15.37 19.01 21.6
Dias	4	7 8 9 10

Dimensions	
Covariance Parameters	5
Columns in X	30
Columns in Z	0
Subjects	120
Max Obs per Subject	1

Number of Observations	
Number of Observations Read	120
Number of Observations Used	120
Number of Observations Not Used	0

Iteration History			
Iteration	Evaluations	-2 Res Log Like	Criterion
0	1	193.12769226	
1	1	177.67549898	0.00000000

Convergence criteria met.

Covariance Parameter Estimates			
Cov Parm	Subject	Group	Estimate
Dias	Rep	Nivel_PB 6.03	0.1067
Dias	Rep	Nivel_PB 13.42	0.2517
Dias	Rep	Nivel_PB 15.37	0.1517
Dias	Rep	Nivel_PB 19.01	0.4452
Dias	Rep	Nivel_PB 21.6	0.4559

Fit Statistics	
-2 Res Log Likelihood	177.7
AIC (Smaller is Better)	187.7
AICC (Smaller is Better)	188.3
BIC (Smaller is Better)	201.6

Null Model Likelihood Ratio Test		
DF	Chi-Square	Pr > ChiSq

Null Model Likelihood Ratio Test		
DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
4	15.45	0.0038

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Nivel_PB	4	100	56.38	<.0001
Dias	3	100	13.62	<.0001
Nivel_PB*Dias	12	100	2.24	0.0152

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 7	1.3842	0.2041	100	6.78	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 8	0.6852	0.2041	100	3.36	0.0011

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 9	0.7521	0.2041	100	3.68	0.0004

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	linear dia 10	0.9692	0.2041	100	4.75	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 7	-0.8747	0.2086	100	-4.19	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 8	-0.4939	0.2086	100	-2.37	0.0198

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 9	-0.4964	0.2086	100	-2.38	0.0192

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	quadr dia 10	-0.3926	0.2086	100	-1.88	0.0627

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB	linear nivel_PB	0.9477	0.1020	100	9.29	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB	quadr nivel_PB	-0.5644	0.1043	100	-5.41	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Dias	linear dias	-0.6126	0.09700	100	-6.32	<.0001

Least Squares Means Estimate						
Effect	Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Dias	quadr dias	0.09550	0.09700	100	0.98	0.3272

Least Squares Means							
Effect	Nivel_PB	Dias	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > |t|
Nivel_PB*Dias	6.03	7	3.5750	0.1334	100	26.81	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	8	3.8233	0.1334	100	28.67	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	9	3.5067	0.1334	100	26.29	<.0001
Nivel_PB*Dias	6.03	10	3.2883	0.1334	100	24.66	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	7	5.3983	0.2048	100	26.36	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	8	5.2817	0.2048	100	25.79	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	9	4.9450	0.2048	100	24.14	<.0001
Nivel_PB*Dias	13.42	10	4.3467	0.2048	100	21.22	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	7	5.2067	0.1590	100	32.74	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	8	4.8450	0.1590	100	30.47	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	9	4.4150	0.1590	100	27.76	<.0001
Nivel_PB*Dias	15.37	10	4.3117	0.1590	100	27.11	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	7	5.7500	0.2724	100	21.11	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	8	4.2050	0.2724	100	15.44	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	9	4.2550	0.2724	100	15.62	<.0001
Nivel_PB*Dias	19.01	10	4.5917	0.2724	100	16.86	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	7	5.1983	0.2757	100	18.86	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	8	5.1783	0.2757	100	18.79	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	9	4.7633	0.2757	100	17.28	<.0001
Nivel_PB*Dias	21.6	10	4.5067	0.2757	100	16.35	<.0001
Nivel_PB	6.03		3.5483	0.06668	100	53.21	<.0001
Nivel_PB	13.42		4.9929	0.1024	100	48.75	<.0001
Nivel_PB	15.37		4.6946	0.07951	100	59.05	<.0001
Nivel_PB	19.01		4.7004	0.1362	100	34.51	<.0001
Nivel_PB	21.6		4.9117	0.1378	100	35.64	<.0001
Dias		7	5.0257	0.09700	100	51.81	<.0001
Dias		8	4.6667	0.09700	100	48.11	<.0001
Dias		9	4.3770	0.09700	100	45.13	<.0001
Dias		10	4.2090	0.09700	100	43.39	<.0001